

Handbok för *therascreen*[®] BRAF Pyro[®] Kit



Version 2

IVD

För in vitro-diagnostisk användning



REF

971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

R2

MAT

1074213SV



QIAGEN provtagnings- och analysmetoder

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla typer av biologiska prover. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

QIAGEN sätter standarden för:

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på www.qiagen.com.

Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring	4
Användningsprinciper	5
Material som medföljer	7
Kitets innehåll	7
Material som behövs men inte medföljer	9
Varningar och säkerhetsåtgärder	11
Säkerhetsinformation	11
Allmänna säkerhetsåtgärder	11
Förvaring och hantering av reagenser	13
Förvaring och hantering av prover	13
Procedur	14
DNA-isolering	14
■ Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet	15
■ Protokoll 2: PCR med de reagenser som medföljer <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	18
■ Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor	21
■ Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24	23
■ Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet	27
■ Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning	29
Tolkning av resultat	33
Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivåmutationer	33
Felsökningsguide	38
Kvalitetskontroll	41
Begränsningar	42
Testets egenskaper	43
Referenser	48
Symboler	48
Kontaktinformation	49
Bilaga A: Konfigurera <i>therascreen</i> BRAF Pyro-analyser	50
Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trågen	53
Beställningsinformation	54

Avsedd användning

therascreen BRAF Pyro Kit är ett in vitro-test med nukleinsyrasekvensering baserat på Pyrosequencing® för kvantitativ detektion av mutationer i kodonerna 600 och 464–469 i den mänskliga BRAF-genen i genomiskt DNA taget från mänsklig vävnad.

therascreen BRAF Pyro Kit är avsett att ge läkare information som hjälper till att avgöra vilka cancerpatienter som sannolikt är lämpade för anti-EGFR-behandling. För in vitro-diagnostisk användning.

Endast för användning med systemet PyroMark® Q24. I systemet PyroMark Q24 ingår:

- Instrumentet PyroMark Q24 och instrumentet PyroMark Q24 MDx.
- Vakuumstationen PyroMark Q24 och vakuumstationen PyroMark Q24 MDx.
- Programmet PyroMark Q24 (version 2.0) och programmet PyroMark Q24 MDx (version 2.0).

Produkten är endast avsedd att användas av professionella användare som tekniker och läkare som har utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer, molekylärbio-logiteknik och systemet PyroMark Q24.

Sammanfattning och förklaring

therascreen BRAF Pyro Kit används för kvantitativa mätningar av mutationer i kodon 600 i exon 15 och 464–469 i exon 11 i den mänskliga BRAF-genen (bild 1).

Exon 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA[GTC]AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
Exon 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCTGAT GGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT[GGA]TCT[GGA]TCATTT[GGA]ACA GTCTACAAGGGAAAGTGGCATG

Bild 1. Genomisk kontext för de sekvenserade regionerna av den mänskliga BRAF-genen (Ensembl-ID ENSG00000157764). Kodonerna 600, 464, 466 och 469 indikeras med fyrkanter.

Kitet består av två analyser: en för detektion av mutationer i kodon 600 och en för detektion av mutationer i kodonerna 464–469 (bild 2). De två regionerna amplifieras separat med PCR och sekvenseras genom den definierade regionen. Sekvenser som omger de definierade positionerna fungerar som

normaliserings- och referenstoppar för kvantifiering och kvalitetsbedömning av analysen.

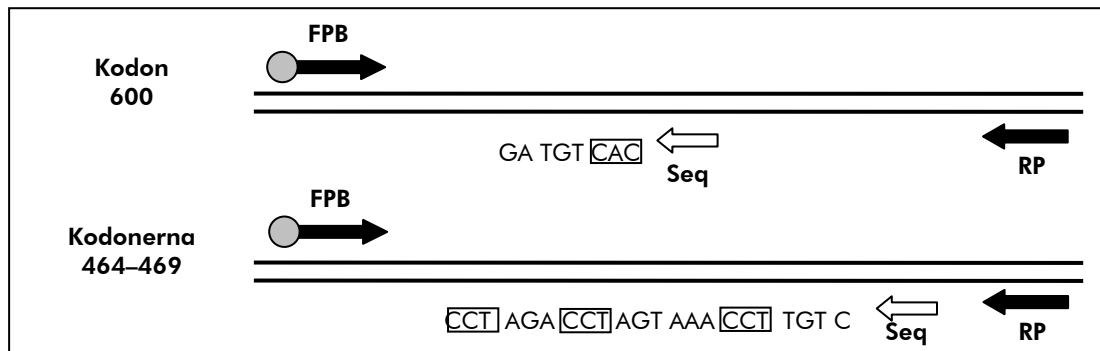


Bild 2. Illustration av BRAF-analysen. Den indikerade sekvensen är den analyserade sekvensen för ett vildtypsprov. **FPB**: Forward PCR-primrar (B indikerar biotinylering); **RP**: Reverse PCR-primrar; **Seq**: Sekvenseringsprimrar.

Båda analyserna sekvenseras i omvänd riktning.

Produkten består av en PCR-primerblandning och en sekvenseringsprimer för varje analys. Primrarna levereras i lösningsform. Varje flaska innehåller 24 µl av varje primer eller primerblandning.

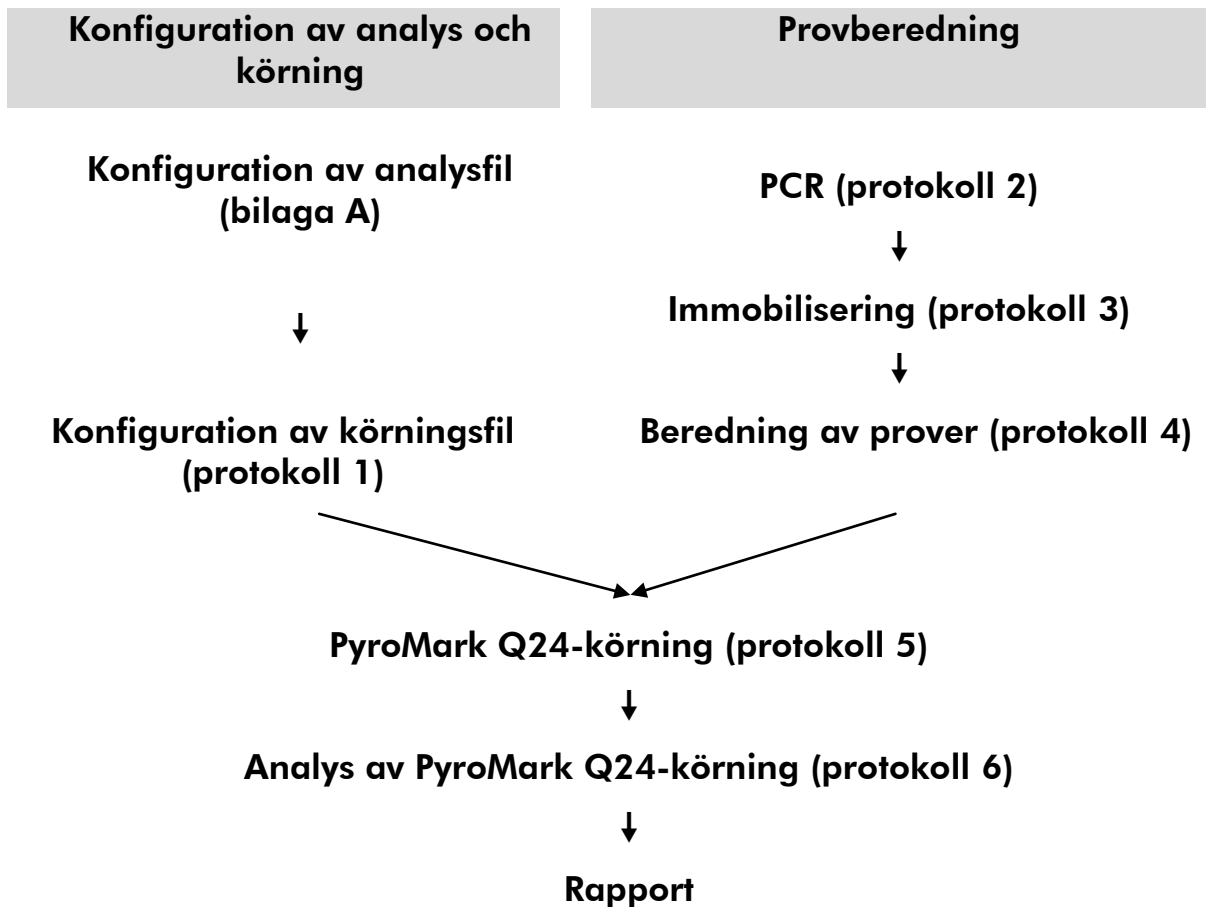
Användningsprinciper

Arbetsflödet på sidan 6 illustrerar analysproceduren. Efter PCR med primrar med kodon 600 och kodonerna 464–469 som mål immobiliseras amplikonerna på Streptavidin Sepharose® High Performance-kulor. Enkelsträngat DNA bereds och de motsvarande sekvenseringsprimrarna binds till DNA. Proverna analyseras sedan på systemet PyroMark Q24 med hjälp av en konfigurationsfil och en körningsfil.

Vi rekommenderar att BRAF Plug-in Report används för att analysera körningen. BRAF Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com. Körningen kan dock även analyseras med hjälp av analysverktyget som är integrerat i systemet PyroMark Q24. "Sequence to Analyze" (Sekvens som ska analyseras) kan justeras för detektion av sällsynta mutationer efter körningen (se "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 29).

Obs: Arbetsflödet har ändrats något jämfört med den föregående versionen av handboken för theascreen BRAF Pyro Kit (version 1, juli 2011). Se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 21 och "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyro-sekvensering på PyroMark Q24", sidan 23 och "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 29.

Arbetsflöde för *therascreen* BRAF Pyro-proceduren



Kontroller

Ometylerat kontroll-DNA ingår i kitet som en positiv kontroll för PCR och sekvenseringsreaktioner. Detta kontroll-DNA har en vildtyps-genotyp i de regioner som sekvenserats med detta kit, och det krävs för korrekt tolkning av resultat och identifiering av lågnivåmutationer (se "Tolkning av resultat", sidan 33). Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning.

Dessutom ska en negativ kontroll (utan mall-DNA) ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Material som medföljer

Kitets innehåll

therascreen BRAF Pyro Kit (förpackning 1/2)

<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	(24)
Katalognr	971470
Antal reaktioner	24
Seq Primer BRAF 600 (Sekvenseringsprimer BRAF 600)	24 µl
Seq Primer BRAF 464–469 (Sekvenseringsprimer BRAF 464–469)	24 µl
PCR Primer BRAF 600 (PCR-primer BRAF 600)	24 µl
PCR Primer BRAF 464–469 (PCR-primer BRAF 464–469)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (PyroMark PCR-huvudmix, 2x)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (CoralLoad®-koncentrat, 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (Ometylerat kontroll-DNA, 10 ng/µl)	100 µl

therascreen-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2)

Buffertar och reagenser	
PyroMark Binding Buffer (PyroMark bindningsbuffert)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (PyroMark hybridiseringsbuffert)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (PyroMark denatureringslösning)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (PyroMark tvättbuffert, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (Enzymblandning)	1 flaska
Substrate Mixture (Substratblandning)	1 flaska
dATP α S	1180 μ l
dCTP	1180 μ l
dGTP	1180 μ l
dTTP	1180 μ l
therascreen <i>BRAF Pyro Kit Handbook</i> (engelska)	1

* Innehåller natriumhydroxid.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDSs) som kan erhållas av respektive tillverkare.

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", sidan 14)
- Pipetter (justerbara)*
- Sterila pipettspetsar (med filter för PCR-uppställning)
- Bänkstående mikrocentrifug*
- Termocykler* och passande PCR-rör
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat.nr 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (kat.nr 9001513 eller 9001514)*[†]
- PyroMark Q24 Software (kat.nr 9019063 eller 9019062)[†]
- PyroMark Q24 Plate (kat.nr 979301)[†]
- PyroMark Q24 Cartridge (kat.nr 979302)[†]
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (kat.nr 9001515 eller 9001517)*[†]
- Plattmixer* för immobilisering med kulor
- Värmeblock* med kapacitet för 80 °C
- PCR-platta med 24 brunnar eller remsor
- Remslock
- Höggradigt rent vatten (Milli-Q[®] 18,2 MΩ x cm eller motsvarande).
Obs: I kitet medföljer tillräckligt med vatten för PCR, DNA-immobilisering och för att lösa upp enzymblandningen och substratblandningen; det behövs ytterligare höggradigt rent vatten för att späda PyroMark tvättbuffert, 10x.
- Etanol (70 %)[‡]

* Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

[†] CE-IVD-märkt i enlighet med EU-direktivet 98/79/EC. Alla andra produkter som listas är inte CE-IVD-märkta baserat på EU-direktivet 98/79/EC.

[‡] Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

Rekommenderade plattmixrar

Plattmixrarna som visas i Tabell 1 rekommenderas för användning med *therascreen* BRAF Pyro Kit.

Tabell 1. Plattmixrar som rekommenderas för användning med *therascreen* BRAF Pyro Kit

Tillverkare	Produkt	Katalognummer
Eppendorf	Thermomixer komfort (basenhet)	5355 000.011
	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)

Rekommenderade plattor med 24 brunnar

Plattorna med 24 brunnar i Tabell 2 rekommenderas för användning med *therascreen* BRAF Pyro Kit.

Tabell 2. Plattor med 24 brunnar rekommenderas för användning med *therascreen* BRAF Pyro Kit.

Tillverkare	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

Varningar och säkerhetsåtgärder

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDSs). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller komponenter till *therascreen* BRAF Pyro Kit.

PyroMark Denaturation Solution



Varning! Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan vara korrosivt för metaller. Sug upp spill för att undvika materiella skador. Förvaras endast i originalbehållaren. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

PyroMark Enzyme Mixture



Innehåller: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Fara! Irriterar huden. Orsakar allvarliga ögonskador. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Vid exponering eller oro: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller doktor/läkare. Ta av förorenade kläder och tvätta dem innan de används på nytt. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

PyroMark Substrate Mixture



Innehåller: acetic acid. Varning! Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp. Ta av förorenade kläder och tvätta dem innan de används på nytt. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Obs: Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- För optimalt resultat krävs att anvisningarna i användarmanualen följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrade egenskaper.
- Arbetsflödet har ändrats något (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor" (sidan 21), "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24" (sidan 23) och "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning" sidan 29) jämfört med den reviderade versionen R1 av *handboken för theascreen BRAF Pyro Kit*.
- Komponenterna i den här produkten räcker för att utföra 24 reaktioner i upp till 5 oberoende körningar.
- Använd sterila pipettspetsar med filter (för PCR-konfiguration).
- Förvara och extrahera positivt material (prover, positiva kontroller och amplikon) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Tina alla komponenter omsorgsfullt i rumstemperatur (15–25 °C) innan analysen påbörjas.
- När komponenterna tinats ska de blandas (genom att pipettera upp och ned upprepade gånger eller genom att vortexa i pulser) och centrifugeras en kort stund.
- Misslyckade resultat får inte ligga till grund för bedömning av mutationsstatus.

Förvaring och hantering av reagenser

therascreen BRAF Pyro Kit levereras i två förpackningar. *therascreen* BRAF Pyro Kit (förpackning 1/2) levereras på torris. PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, ometylerat kontroll-DNA och alla primrar ska förvaras i -30 till -15 °C direkt vid ankomst.

therascreen-buffertar och -reagenser (förpackning 2/2) som innehåller buffertar, enzymblandning, substratblandning, dATP α S, dCTP, dGTP och dTTP (reagenserna för analys med pyrosekvensering) levereras i kylförpackning. De här komponenterna ska förvaras i $2-8$ °C direkt vid ankomst. För att minimera försämring av aktiviteten rekommenderar vi att både enzymblandningen och substratblandningen förvaras i de medföljande flaskorna.

Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning är stabilt i minst 10 dagar i $2-8$ °C. Rekonstituerad enzymblandning och substratblandning kan frysas och förvaras i flaska i -30 till -15 °C. Frusna reagenser ska inte genomgå mer än 3 frys-/upptiningscykler.

Obs: Nukleotider ska inte frysas.

therascreen BRAF Pyro Kit är hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten om det förvaras under de här förhållandena.

Förvaring och hantering av prover

Alla prover ska betraktas som potentiellt smittbärande material.

Provmaterialet är mänskligt DNA som extraherats från formalinfixerade, paraffininbäddade prover (FFPE).

Procedur

DNA-isolering

Systemegenskaperna har fastställts med EZ1[®] DNA Tissue Kit och QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit för extrahering av mänskligt DNA från formalinfixerade, paraffininbäddade tumörprover.

De QIAGEN[®]-kit som visas i tabell 3 rekommenderas för DNA-rening från de angivna mänskliga provtyperna för användning med *therascreen* BRAF Pyro Kit. Utför DNA-reningen enligt instruktionerna i kit-handböckerna.

Tabell 3. DNA-reningskit som rekommenderas för användning med *therascreen* BRAF Pyro Kit

Provmaterial	Kit för isolering av nukleinsyra	Katalognummer (QIAGEN)
Paraffininbäddad vävnad	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

* Följ protokollet för användning med paraffininbäddad vävnad. EZ1 DNA Tissue Kit ska användas tillsammans med EZ1 Advanced (kat.nr 9001410 eller 9001411) och EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9018298), med EZ1 Advanced XL (kat.nr 9001492) och EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9018700) eller med BioRobot[®] EZ1 (kat.nr 9000705; har utgått ur sortimentet) och EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat.nr 9015862).

Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet

Viktigt att tänka på före start

- Om det behövs kan LOB bekräftas genom att ett vildtypsprov används för att ta fram en full platta med resultat. Mer information finns i riktlinjen CLSI EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".

Saker som ska göras före start

- Om BRAF Plug-in Report inte har installerats ska du skapa en analyskonfiguration (se bilaga A: Konfigurera *therascreen* BRAF Pyro-analyser, sidan 50). Detta behöver endast göras en gång innan du kör *therascreen* BRAF Pyro-analysen för första gången. Om BRAF Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24 under sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/BRAF". BRAF Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com.

Procedur

1. Klicka på i verktygsfältet.

En ny körningsfil skapas.

2. Skriv in körningsparametrarna (se "Körningsparametrar", sidan 16).

3. Förbered plattan genom att lägga till analyser för kodon 600 och kodonerna 464–469 i brunnar som motsvarar de prover som ska analyseras.

Obs: Ett negativt prov (utan mall-DNA) ska ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Obs: Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning (se "Kontroller", sidan 6).

4. När körningen är iordningställd och redo att köras på systemet PyroMark Q24 ska du skriva ut en lista med de volymer av enzymblandning, substratblandning och nukleotider som behövs, samt iordningställandet av plattan. Välj "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) och när rapporten sedan visas klickar du på .

5. Stäng körningsfilen och kopiera den på ett USB-minne (medföljer systemet) via Utforskaren i Windows®.

Obs: Den utskrivna Pre Run Information-rapporten kan användas som mall för provuppställningen (se "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 21).

Information om körning av plattan på PyroMark Q24-systemet finns i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 27.

Körningsparametrar

"Run name" (Namn på körningen):	Namnet på körningen ges när filen sparas. Om du byter namn på filen ändras också namnet på körningen.
"Instrument method" (Instrumentmetod):	Välj instrumentmetod efter vilken kassett som ska användas för körningen. Se instruktionerna som medföljer produkterna.
"Plate ID" (Platt-ID):	Valfritt: Ange ID för PyroMark Q24 Plate.
"Bar code" (Streckkod):	Valfritt: Ange ett streckodsnummer för plattan eller, om du har en streckodsläsare ansluten till din dator, placera muspekaren i textrutan "Barcode" (Streckkod) genom att klicka i rutan och läs in streckkoden.
"Kit and Reagent ID" (Kit- och reagens-ID):	Valfritt: Ange lotnumret för det <i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit som ska användas. Lotnumret finns på produktetiketten. Obs: Vi rekommenderar att du anger både reagens-ID och kit-ID så att eventuella oväntade problem som uppstår med reagenserna kan spåras.
Anteckning om körningen:	Valfritt: Gör en anteckning om innehållet i eller syftet med körningen.

Lägga till analysfiler

Om du vill lägga till en analysfil för en brunn gör du på ett av följande sätt:

- Högerklicka på brunnen och välj "Load Assay" (Ladda analys) på kontextmenyn.
- Markera analysen i snabbmenyn, klicka på den och dra den till brunnen.

En brunn färgkodas enligt den analys som laddas för brunnen.

Ange prov-ID och anteckningar

Om du ska ange ett prov-ID eller en anteckning markerar du cellen och skriver in texten.

Om du ska redigera ett prov-ID eller en anteckning markerar du antingen cellen (det aktuella innehållet markeras) eller dubbelklickar på cellen.

Protokoll 2: PCR med de reagenser som medföljer *therascreen* BRAF Pyro Kit

Det här protokollet är avsett för PCR-amplifiering av en region som innehåller kodon 600, och en separat PCR-amplifiering av en region som innehåller kodonerna 464–469 med hjälp av *therascreen* BRAF Pyro Kit.

Viktigt att tänka på före start

- HotStarTaq[®] DNA-polymeras i PyroMark PCR-huvudmix kräver aktivering i **15 minuter vid 95 °C**.
- Förbered alla reaktionsblandningar i ett område avskilt från det område som används för DNA-rening, tillägg av mall-DNA till PCR, PCR-produktanalys eller beredning av prover före analys med pyrosekvensering.
- Använd engångsspetsar med hydrofobiskt filter för att undvika korskontaminering.

Saker som ska göras före start

- Innan rören med PCR-primrar öppnas, ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Justera koncentrationen av kontroll och prov-DNA vid behov till 0,4–2 ng/μl.

Procedur

1. Tina alla komponenter som behövs (se tabell 4).

Blanda väl före användning.

2. Bered en reaktionsmix för varje PCR-primer enligt tabell 4.

Reaktionsmixen innehåller vanligtvis alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Bered en volym reaktionsmix som är större än vad som krävs för det totala antalet PCR-analyser som ska utföras.

Tabell 4. Beredning av reaktionsmix för varje PCR-primermix

Komponent	Volym/reaktion (µl)
PyroMark PCR-huvudmix, 2x	12,5
CoralLoad-koncentrat, 10x	2,5
PCR-primer BRAF kodon 600 eller PCR-primer BRAF kodonerna 464–469	1,0
Vatten (H ₂ O, medföljer)	4,0
Total volym	20,0

3. Blanda reaktionsmixen väl och fördela 20 µl i varje PCR-rör.

Det är inte nödvändigt att ha PCR-rör på torr is eftersom HotStarTaq DNA-polymeras är inaktivt i rumstemperatur.

4. Tillsätt 5 µl mall-DNA (2–10 ng genomiskt DNA) i varje PCR-rör (se tabell 5) och blanda väl.

Obs: En negativ kontroll (utan mall-DNA) ska ingå i varje PCR-konfiguration för minst en analys.

Obs: Inkludera ett prov med ometylerat kontroll-DNA för varje analys i varje pyrosekvenseringskörning (se "Kontroller", sidan 6).

Tabell 5. Beredning av PCR

Komponent	Volym/reaktion (µl)
Reaktionsmix	20
Prov-DNA	5
Total volym	25

5. Programmera termocyklern enligt tillverkarens anvisningar med hjälp av villkoren som anges i tabell 6.

Tabell 6. Optimerat cyklingsprotokoll

			Kommentar
Initialt aktiveringssteg:	15 minuter	95 °C	HotStarTaq DNA-polymeras aktiveras i det här värmesteget.
3-stegscyklning:			
Denaturering	20 sekunder	95 °C	
Hybridisering	30 sekunder	53 °C	
Extension	20 sekunder	72 °C	
Antal cykler	42		
Slutlig extension:	5 minuter	72 °C	

6. Placera PCR-rören i termocyklern och starta cyklingsprogrammet.
7. Fortsätt efter amplifieringen med "Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor", sidan 21.

Protokoll 3: Immobilisering av PCR-produkter på Streptavidin Sepharose High Performance-kulor

Det här protokollet är avsett för immobilisering av mall-DNA på Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) före analys på systemet PyroMark Q24.

Saker som ska göras före start

- Låt alla reagenser och lösningar uppnå rumstemperatur (15–25 °C) innan du sätter igång.

Viktigt att tänka på före start

- Arbetsflödet har ändrats något jämfört med den föregående versionen av handboken för *therascreen* BRAF Pyro Kit (version 1, juli 2011, steg 2).

Procedur

1. Skaka försiktigt flaskan som innehåller Streptavidin Sepharose High Performance tills lösningen är homogen.
2. Bered en huvudmix för DNA-immobilisering enligt tabell 7. Bered en volym som är 10 % större än vad som krävs för det totala antalet reaktioner som ska utföras.

Tabell 7. Huvudmix för DNA-immobilisering

Komponent	Volym/prov (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	1
PyroMark bindningsbuffert	40
Vatten (H ₂ O, medföljer)	29
Total volym	70

Obs: Det här protokollet gäller Streptavidin Sepharose High Performance med lotnummer 10057037 eller högre. Vid användning av Streptavidin Sepharose High Performance Beads med ett lotnummer som är lägre än 10057037 måste volymen kulor som används per prov ökas till 2 µl samtidigt som vattnet minskas med lämplig volym.

3. Tillsätt 70 µl huvudmix i brunnarna i en PCR-platta med 24 brunnar eller remsor enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15).

- 4. Tillsätt 10 µl biotinylerad PCR-produkt från protokoll 2 i varje brunn med huvudmix enligt den förinställning som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15).**

Obs: Den totala volymen per brunn ska vara 80 µl efter tillsats av huvudmix och PCR-produkt.

- 5. Förslut PCR-plattan (eller remsorna) med hjälp av remslocken.**

Obs: Se till att det inte kan förekomma läckage mellan brunnarna.

- 6. Skaka PCR-plattan i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter vid 1 400 rpm.**

Obs: Förbered under tiden vakuumbstationen PyroMark Q24 för provberedning enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

- 7. Fortsätt omedelbart med "Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24", sidan 23.**

Obs: Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Infångning av kulorna måste ske omedelbart efter skakning.

Om mer än 1 minut har gått sedan plattan (eller remsorna) skakades ska du skaka på nytt i 1 minut innan kulorna fångas in.

Protokoll 4: Beredning av prover före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24

Det här protokollet är avsett för beredning av enkelsträngat DNA och bindning av sekvenseringsprimern till mallen före analys med pyrosekvensering på PyroMark Q24.

Viktigt att tänka på före start

- Innan rören med sekvenseringsprimrar öppnas, ska de centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i rören samlas upp.
- Tillsätt de 2 olika sekvenseringsprimrarna enligt den förinställning för plattan som gjordes vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15), beroende på analysregion (kodon 600 eller kodonerna 464–469).
- Arbetsflödet har ändrats något jämfört med den föregående versionen av handboken för *therascreen* BRAF Pyro Kit (version 1, juli 2011, steg 18). Förkorta inte tiden för nedkylning av proverna efter uppvärmning till 80 °C.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) och byt ut filterproberna när detta indikeras.

Saker som ska göras före start

- Placera en PyroMark Q24-platthållare på ett värmeblock med temperaturen 80 °C för användning i steg 17. Lämna en andra PyroMark Q24-platthållare i rumstemperatur (15–25 °C) för användning i steg 18.
- PyroMark tvättbuffert levereras som ett koncentrat, 10x. Innan det används första gången ska det spädas till en 1x-arbetslösning genom tillsats av 225 ml höggradigt rent vatten i 25 ml PyroMark tvättbuffert, 10x (slutlig volym 250 ml).

Obs: 1x PyroMark tvättbuffert-arbetslösning är stabil i 2–8 °C till angivet utgångsdatum.

Procedur

- 1. Späd en tillräcklig mängd av varje sekvenseringsprimer, sekvenseringsprimer BRAF 600 eller sekvenseringsprimer BRAF 464–469, i PyroMark hybridiseringsbuffert enligt tabell 8.**

Bered en volym utspädd sekvenseringsprimer som är större än den volym som krävs för det totala antalet prover som ska sekvensbestämmas (antalet prover + en extra).

Späd inte ut och förvara någon mer sekvenseringsprimer.

Tabell 8. Exempel på spädning av sekvenseringsprimrarna

Komponent	Volym/prov (μ l)	Volym för 9 + 1 reaktioner (μ l)
Sekvenseringsprimer BRAF 600 eller Sekvenseringsprimer BRAF 464–469	0,8	8
PyroMark hybridiseringsbuffert	24,2	242
Total volym	25	250

2. Tillsätt 25 μ l utspädd sekvenseringsprimer i varje brunn i PyroMark Q24-plattan enligt körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15).

Obs: Behåll en av PyroMark Q24-platthållarna (medföljer vakuumbrytaren PyroMark Q24) i rumstemperatur (15–25°C), och använd den som hjälp när plattan bereds och flyttas.

3. Placera PCR-plattan (eller remsorna) från protokoll 3 och PyroMark Q24-plattan på arbetsbordet (bild 3).

Inspektera PCR-plattan och säkerställ att Sepharose-kulorna ligger i lösning.

Obs: Se till att plattan är i samma läge som när proverna laddades.



Bild 3. Placering av PCR-platta (eller remsor) och PyroMark Q24-platta på vakuumbrytaren.

4. Applicera vakuumbrytaren i verktyget genom att aktivera vakuumbrytaren.

5. Sänk försiktigt ned vakuumverktygets filterprober i PCR-plattan (eller remsorna) för att fånga in kulorna som innehåller immobiliserad mall. Håll proberna på plats i 15 sekunder. Var försiktig när du tar upp vakuumverktyget.

Obs: Sepharose-kulor sedimenterar snabbt. Om mer än 1 minut har gått sedan plattan (eller remsorna) skakades ska du skaka på nytt i 1 minut innan kulorna fångas in.

Inspektera PCR-plattan för att se till att alla proverna tas upp fullständigt av vakuumverktyget.

6. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml 70-procentig etanol (bild 3). Spola filterproberna i 5 sekunder.
7. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 40 ml denatureringslösning (bild 3). Spola filterproberna i 5 sekunder.
8. Flytta vakuumverktyget till tråget som innehåller 50 ml tvättbuffert (bild 3). Spola filterproberna i 10 sekunder.
9. Lyft upp vakuumverktyget och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (bild 4).

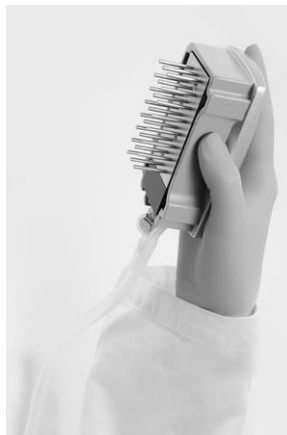


Bild 4. Bilden visar vakuumverktyget i mer än 90° lodrät lutning.

10. Stäng verktygets vakuumbrytare (Off) medan vakuumverktyget hålls ovanför PyroMark Q24 Plate.
11. Frigör kulorna i PyroMark Q24-plattan genom att sänka ned filterproberna i den utspädda sekvenseringsprimern och flytta verktyget försiktigt fram och tillbaka.
Obs: Var försiktig så att du inte skadar ytan på PyroMark Q24-plattan genom att skrapa den med filterproberna.
12. Flytta vakuumverktyget till tråget med höggradigt rent vatten (bild 3) och skaka det i 10 sekunder.
13. Tvätta filterproberna genom att sänka ned proberna i höggradigt rent vatten (bild 3) och applicera vakuum. Spola proberna med 70 ml höggradigt rent vatten.

- 14. Lyft upp vakuumverktyget och luta det bakåt, mer än 90° lodrät lutning, i 5 sekunder så att vätskan rinner av filterproberna (bild 4).**
- 15. Stäng verktygets vakuumbrytare (Off) och placera verktyget i parkeringsposition (P).**
- 16. Stäng av vakuumpumpen.**

Obs: I slutet av arbetsdagen ska vätskeavfall och återstående lösning kasseras och vakuumstationen PyroMark Q24 ska kontrolleras avseende damm och spill (se bilaga B, sidan 53).
- 17. Värm PyroMark Q24-plattan med prover i 80 °C i 2 minuter med hjälp av en föruppvärmd PyroMark Q24-platthållare.**
- 18. Ta bort PyroMark Q24-plattan från platthållaren och placera den på en andra PyroMark Q24-platthållare som förvarats i rumstemperatur (15–25 °C) för att låta proverna svalna till rumstemperatur i 10–15 minuter.**
- 19. Fortsätt med "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 27.**

Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet

Det här protokollet beskriver hur du bereder och laddar PyroMark Gold Q24-reagenser i PyroMark Q24-kassetten samt hur du startar och slutför en körning på PyroMark Q24. Mer information om hur du utför en körning finns i användarmanualen till PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

Viktigt att tänka på före start

- I rapporten "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) vid körningskonfigurationen (se "Protokoll 1: Konfigurera PyroMark Q24-systemet", sidan 15) finns information om mängden nukleotider, enzym och substratbuffert som behövs för en specifik körning.

Saker som ska göras före start

- Slå på PyroMark Q24. Strömbrytaren sitter på instrumentets baksida.

Procedur

1. **Lös upp frystorkat enzym och substratblandningar i vardera 620 µl vatten (H₂O, medföljer).**
2. **Blanda genom att skaka flaskan försiktigt.**

Obs: Vortexa inte!

Obs: Låt blandningen stå i rumstemperatur (15–25 °C) i 5–10 minuter för att försäkra dig om att den är helt upplöst. Kontrollera att lösningen inte är grumlig innan du fyller PyroMark Q24-kassetten. Om reagenserna inte ska användas omedelbart ska reagensflaskorna placeras på is[§] eller i ett kylskåp.

3. **Låt reagenserna och PyroMark Q24-kassetten uppnå rumstemperatur (20–25 °C).**
4. **Placera PyroMark Q24-kassetten så att etiketten är vänd mot dig.**
5. **Ladda PyroMark Q24-kassetten med korrekta volymer av nukleotider, enzym och substratblandningar enligt bild 5.**

Se till att inga luftbubblor överförs från pipetten till kassetten.

[§] Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (MSDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.



Bild 5. PyroMark Q24-kassetten sedd ovanifrån. Märkningarna motsvarar etiketterna på reagensflaskorna. Tillsätt enzymblandning (E), substratblandning (S) och nukleotider (A, T, C, G) enligt den mängd som anges i rapporten Pre Run (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg) vid körningskonfigurationen.

6. **Öppna kassettdörren och sätt in den fyllda reagenskassetten med etiketten utåt. Tryck in kassetten helt och tryck den sedan nedåt.**
7. **Kontrollera att randen är synlig framför kassetten och stäng dörren.**
8. **Öppna ramen som håller plattan och placera plattan på värmeblocket.**
9. **Stäng ramen och instrumentluckan.**
10. **Sätt in USB-minnet (med körningsfilen) i USB-porten på instrumentets framsida.**
Obs: Ta inte bort USB-minnet förrän körningen är avslutad.
11. **Välj "Run" (Kör) i huvudmenyn (med skärmknapparna ▲ och ▼) och tryck på "OK".**
12. **Välj körningsfilen med skärmknapparna ▲ och ▼.**
Obs: Om du vill se innehållet i en mapp markerar du mappen och trycker på "Select" (Välj). Om du vill gå tillbaka till föregående fönster trycker du på "Back" (Bakåt).
13. **När körningsfilen är vald trycker du på "Select" (Välj) för att starta körningen.**
14. **När körningen är avslutad och instrumentet bekräftar att körningsfilen har sparats på USB-minnet trycker du på "Close" (Stäng).**
15. **Ta ut USB-minnet.**
16. **Öppna instrumentluckan.**
17. **Öppna kassettdörren och ta bort reagenskassetten genom att lyfta upp och dra ut den.**
18. **Stäng kassettdörren.**
19. **Öppna ramen som håller plattan och ta bort plattan från värmeblocket.**
20. **Stäng ramen och instrumentluckan.**
21. **Kassera plattan och rengör kassetten enligt instruktionerna i produktdatabladet som medföljde kassetten.**
22. **Analysera körningen enligt "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning", sidan 29.**

Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning

Det här protokollet beskriver mutationsanalysen av en slutförd BRAF-körning med programmet PyroMark Q24.

Procedur

1. Sätt in USB-minnet (med den bearbetade körningsfilen) i datorns USB-port.
2. Flytta körningsfilen från USB-minnet till önskad plats på datorn med hjälp av Utforskaren i Windows.
3. Öppna körningsfilen i AQ-läget i programmet PyroMark Q24 genom att antingen välja "Open" (Öppna) i menyn "File" (Arkiv) eller genom att dubbelklicka på filen (👉) i snabbmenyn.
4. Körningen kan analyseras på 2 sätt. Gå till steg 5 om du använder BRAF Plug-in Report. Gå till steg 6 om du använder den AQ-analys som är integrerad i systemet PyroMark Q24.

Obs: Vi rekommenderar starkt att BRAF Plug-in Report används för tolkning av resultat. BRAF Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com. Rapporten garanterar att de respektive LOD-värdena (

Tabell 9) och de olika "Sequences to Analyze" (Sekvens att analysera) används för att detektera alla mutationer automatiskt.

Obs: De komplexa mutationerna i BRAF kodon 600 och 469 kan inte analyseras med AQ-analysen i programmet PyroMark Q24. Vi rekommenderar att BRAF Plug-in Report används för analys av komplexa mutationer i kodon 600 och 469.

Obs: Vissa mutationer i kodon 600 samt mutationerna G469A och G469S kanske inte särskiljs exakt vid mutationsnivåer under 10 %.

5. Använda BRAF Plug-in Report:

Generera en rapport genom att välja "AQ Add On Reports/BRAF" (AQ-tilläggsrapporter/BRAF) i menyn "Reports" (Rapporter) (se bild 6).

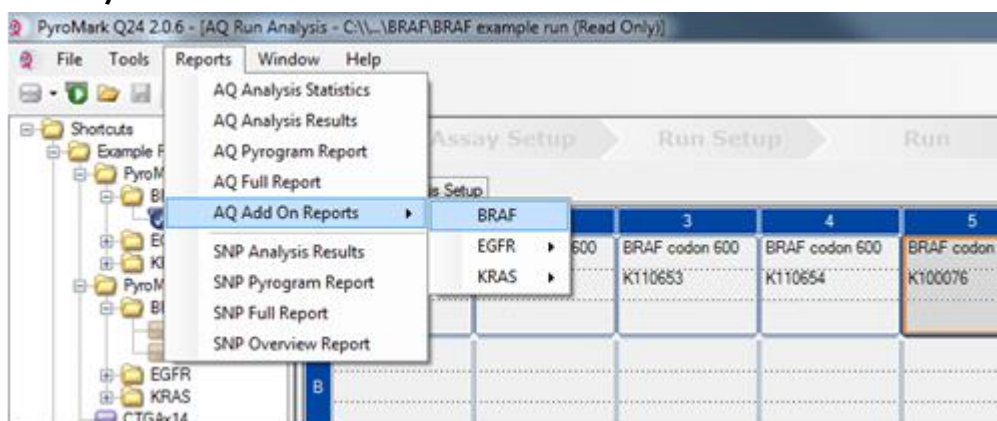


Bild 6. Menyn BRAF Plug-in Report (BRAF plugin-rapport).

Brunnarna analyseras automatiskt med avseende på alla mutationer för vilka LOD anges i

Tabell 9. Resultaten visas i en översiktstabell (bild 7) som följs av detaljerad resultatinformation, t.ex. pyrogram och analyskvalitet.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	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.

Bild 7. BRAF plugin-rapport.

6. Använda AQ-analys:

Klicka på en av analysknapparna för att analysera körningen och få en översikt av resultaten.



Analysera alla brunnar.



Analysera den markerade brunnen.

Analysresultaten (allelfrekvenser) och kvalitetsbedömning visas ovanför variabelns position i Pyrogram[®]-kurvan. Mer information om hur en körning analyseras finns i användarmanualen till PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. Generera en rapport genom att välja "AQ Full Report" (AQ fullständig rapport) eller "AQ Analysis Results" (AQ-analysresultat) på menyn "Reports" (Rapporter).

Obs: För så pålitliga resultat som möjligt rekommenderar vi enskilda höjdtoppar på över 30 RLU. Ange 30 RLU som "required peak height for passed quality" (tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet) i analyskonfigurationen (se bilaga A och användarmanualen till PyroMark Q24 [*PyroMark Q24 User Manual*]).

Obs: Rapporten "AQ Analysis Results" (AQ-analysresultat) bör användas för dokumentation och tolkning av allelkvantifiering. De siffror som visas i pyrogrammet är avrundade och anger inte den exakta kvantifieringen.

Obs: Pyrogrammet ska alltid jämföras med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. De uppmätta topparna ska matcha höjden på histogramstaplarna.

Omanalys av prover utan detekterad GTG → GAG-mutation eller med kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad)

Den mest frekventa mutationen i BRAF är GTG → GAG i nukleotid 1799 (andra basen i kodon 600). Därför är standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) inriktad på denna mutation enligt definitionen i analyskonfigurationen (se Bilaga A: Konfigurera theascreen BRAF Pyro-analyser, sidan 50).

Vi rekommenderar omanalys av alla prover där ingen mutation har detekterats med standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) samt av prover som kvalitetsbedömts som "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad), eller som har toppar som inte matchar höjden på histogramstaplarna. Kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) och "Failed" (Misslyckad) kan indikera en mutation som inte hittas av standarden "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera), vilket resulterar i topphöjdsavvikelser.

Om du vill omanalysera och fokusera på mutationer i nukleotid 1798 eller 1799 i kodon 600 går du till "Analysis Setup" (Analyskonfiguration) och ändrar "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) till en av de ytterligare "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) som listas i "Bilaga A: Konfigurera theascreen BRAF Pyro-analyser" på sidan 50. Klicka på "Apply" (Tillämpa), och "To All" (För alla) när fönstret "Apply Analysis Setup" (Tillämpa analyskonfiguration) visas.

Uppdaterade frekvenser av mutationer i den mänskliga BRAF-genen i kodon 600 och kodonerna 464–469 finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Obs: När du har ändrat "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) ska du se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

Obs: Ytterligare sällsynta eller oväntade mutationer kan finnas i den region som sekvenserats och kan analyseras med alternativet "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) där hänsyn ska tas till oväntade mutationer.

Obs: Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta eller oväntade mutationer, rekommenderar vi att provet körs på nytt.

Tolkning av resultat

Tolkning av analysresultat och detektion av lågnivå-mutationer

Vi rekommenderar starkt att ometylerat kontroll-DNA ingår i varje körning för jämförelse och som kontroll för bakgrunds nivåer. Den uppmätta frekvensen för kontrollprovet ska vara mindre än eller lika stor som LOB (limit of blank).

Alla prover ska undersökas enligt detektionsgränsen (LOD,

Tabell 9) och tolkas på följande sätt.

- Mutationsfrekvens $< \text{LOD}$: Mutation inte detekterad
- Mutationsfrekvens $\geq \text{LOD}$ och $\leq \text{LOD} + 3$ procentenheter: Potentiell lågnivåmutation

Obs: Om BRAF Plug-in Report används (se steg 5 av "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 27) och detta inträffar genereras ett varningsmeddelande.

Prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation ska endast anses vara positiva för mutationen om det bekräftas genom att de körs om i duplikat tillsammans med ett prov med ometylerat kontroll-DNA. Resultatet för båda duplikaten ska vara $\geq \text{LOD}$ och inte samma som kontrollprovet. Annars ska provet bedömas som "No mutation detected" (Ingen mutation detekterad).

- Mutationsfrekvens $> \text{LOD} + 3$ procentenheter: Mutation

Om BRAF Plug-in Report används görs detta automatiskt.

Obs: Vi rekommenderar att BRAF Plug-in Report används för tolkning av resultat. För en närmare undersökning av prover med en rapporterad potentiell lågnivåmutation rekommenderar vi att även analysera provet manuellt i tillämpningsprogrammet (t.ex. för jämförelse med mutationsfrekvensen i kontrollprovet).

Obs: Vissa mutationer i kodon 600 samt mutationerna G469A och G469S kanske inte särskiljs exakt vid mutationsnivåer under 10 %.

Obs: En uppmätt frekvens som ligger över LOB i kontrollprovet indikerar en högre bakgrundsnivå än vanligt i respektive körning, vilket kan påverka allelkvantifiering, särskilt för låga mutationsnivåer. I det här fallet är uppmätta frekvenser i intervallet från LOD (

Tabell 9) till LOD + 3 procentenheter inte en grund för bedömning av mutationsstatus. Vi rekommenderar att prover med en potentiell lågnivåmutation körs på nytt.

Obs: Ett beslut om behandling för cancerpatienter får inte enbart baseras på BRAF-mutationsstatus.

Tabell 9. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procent-enheter)	LOD (procent-enheter)	COSMIC ID* (V46)
Kodon 600 (GTG), analyserad bakåt (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Kodon 469 (GGA), analyserad bakåt (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Kodon 466 (GGA), analyserad bakåt (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Kodon 464 (GGA), analyserad bakåt (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Den lägsta mutationsnivån i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \geq LOD.

Karakteristiska resultat

Karakteristiska pyrogramresultat visas i bild 8–10.

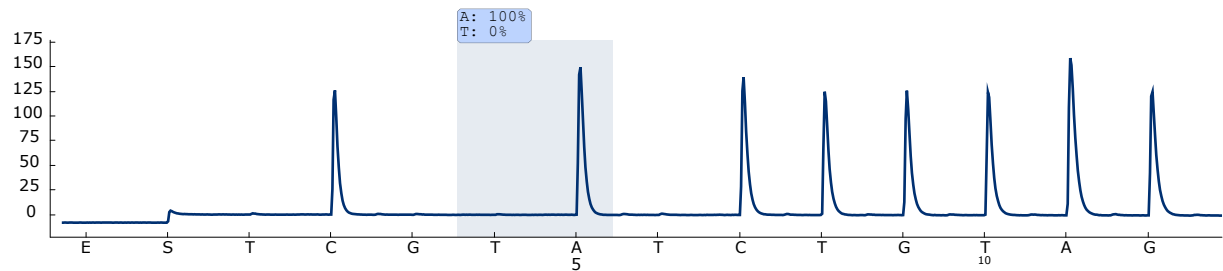


Bild 8. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp i kodon 600 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CWCTGTAGC.

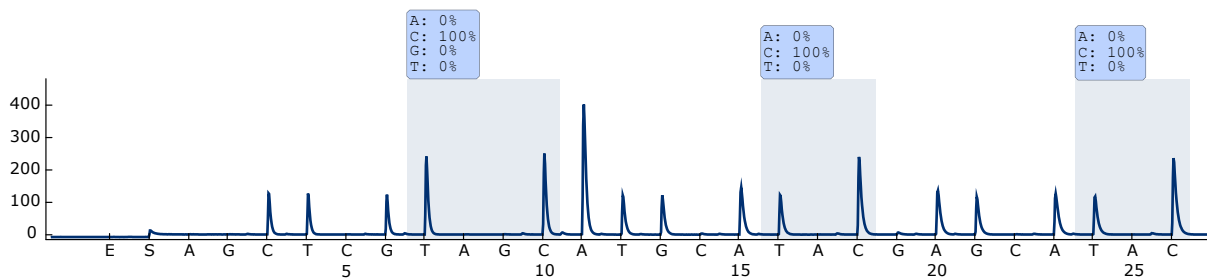


Bild 9. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av ett prov med en vildtyps-genotyp i kodonerna 464–469 med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA.

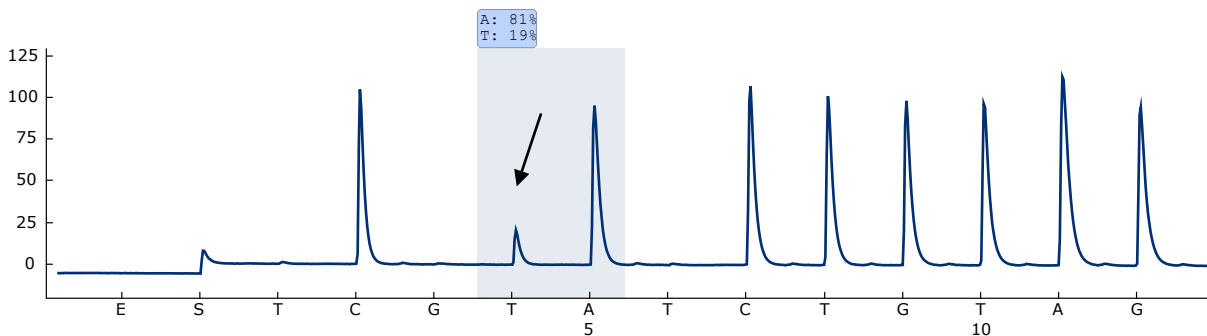


Bild 10. Pyrogramkurva som erhålls efter analys av prover med en GTG → GAG-mutation (V600E) i bas 2 i kodon 600 (nukleotid 1799, indikeras med en pil) med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CWCTGTAGC.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vetenskapsmännen på QIAGENs tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på www.qiagen.com).

Obs: Se användarmanualen till PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) för allmän felsökning av instrumentet.

Kommentarer och förslag

Signaler i kontrollen utan mall (negativ kontroll)

- | | |
|-------------------------------|---|
| a) Överhörning mellan brunnar | Signalen från en brunn har detekterats i en intilliggande brunn. Undvik att placera prover med hög signalintensitet bredvid brunnar med kontroll utan mall. |
| b) PCR-kontaminering | Använd sterila pipettspetsar med filter. Förvara och extrahera material såsom prover, kontroller och amplikon separerat från PCR-reagenser. |

Dålig eller oväntad sekvens

- | | |
|------------------------------------|---|
| a) Genomiskt DNA av dålig kvalitet | Genomiskt DNA av dålig kvalitet kan göra att PCR misslyckas. Analysera PCR-prover med hjälp av elektroforetisk teknik (t.ex. QIAxcel® Advanced System eller agarosgelelektrofores). |
|------------------------------------|---|

Kommentarer och förslag

Resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad)

- a) Låg topphöjd
- Hanteringsfel vid PCR-konfigurationen eller provberedningen innan pyrosekvensering kan resultera i låga toppar.
- Det är viktigt att proverna tas upp helt av vakuumpverktyget. Se till att vakuumpverktyget sänks ned långsamt i proverna och att geometrin för den PCR-platta eller de remsor som används för immobilisering tillåter fullständig upptagning av proverna.
- Utför regelbundna funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) och byt ut filterproberna när detta indikeras.
- Om varningsmeddelandet "Check" (Kontrollera) visas ska du jämföra pyrogrammet noggrant med histogrammet, vilket visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna är resultatet giltigt. Annars rekommenderar vi att provet körs på nytt.
- b) Mutationen är inte definerad i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
- Justera sekvensen som ska analyseras i analyskonfigurationen (se "Bilaga A: Konfigurera *therascreen* BRAF Pyro-analyser", sidan 50) och analysera körningen på nytt.
- c) Oväntad och sällsynt mutation
- En kvalitetsbedömning med resultatet "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad) kan orsakas av ett oväntat mönster av toppar. Detta kan indikera en oväntad mutation som inte analyseras av "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera). Dessa prover ska analyseras med alternativet "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) där hänsyn ska tas till oväntade mutationer.

Kommentarer och förslag

- d) Varning om topphöjdsavvikelse för en dispensering
- Pyrogrammet ska jämföras noggrant med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om de uppmätta topparna inte matchar höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta mutationer, rekommenderar vi att provet körs på nytt.
- e) Varningsmeddelandet "High peak height deviation" (Topphöjdsavvikelse) för dispensering 6 med kodon 600-analysen och "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
CAYCTGTAGC
- Pyrogrammet ska jämföras noggrant med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om bakgrundsbruset vid dispensering T6 ligger nedanför förväntad nivå och de återstående uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna kan varningsmeddelandet och kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad) ignoreras.
- f) Varningsmeddelandet "High peak height deviation" (Topphöjdsavvikelse) för dispensering 3 eller 4 med kodon 600-analysen och "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
CVCTGTAGC
- Pyrogrammet ska jämföras noggrant med histogrammet, vilket kan visas genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Om bakgrundsbruset vid dispensering G3 eller T4 ligger nedanför förväntad nivå och de återstående uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna kan varningsmeddelandet och kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) eller "Failed" (Misslyckad) ignoreras.
- g) Varningsmeddelandet "The sequence contains less reference peaks than required" (Sekvensen innehåller färre referenstoppar än vad som krävs) visas i kodon 600-analysen med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera)
CVCTGTAGC
- Om de uppmätta topparna matchar höjden på histogramstaplarna kan varningsmeddelandet och kvalitetsbedömningen "Check" (Kontrollera) ignoreras.

Kommentarer och förslag

Högt bakgrundsvärde

- | | |
|--|--|
| a) Felaktig förvaring av nukleotider | Förvara nukleotider i 2–8 °C. Förvaring i –15 till –25 °C kan orsaka en ökning i bakgrunden. |
| b) Kort tid för nedkylning av prover innan analys med pyrosekvensering | Förvara proverna på en PyroMark Q24-platthållare i rumstemperatur i 10–15 minuter. Förkorta inte tiden för nedkylning. |
| c) Kontaminering av kassetten | Rengör kassetten noggrant enligt instruktionerna i produktdatabladet. Förvara kassetten skyddad mot ljus och damm. |

Inga signaler i positiva kontroller (ometylerat kontroll-DNA)

- | | |
|--|--|
| a) Otillräcklig mängd enzym eller substratblandning för alla brunnar | Se till att fylla PyroMark Q24-kassetten enligt "Pre Run Information" (Info före körning) på menyn "Tools" (Verktyg). |
| b) Reagenser felaktigt förvarade eller spädda | Bered <i>therascreen</i> -reagenserna enligt instruktionerna i "Protokoll 5: Köra PyroMark Q24-systemet", sidan 27. |
| c) PCR- eller provberedningsfel | Hanteringsfel vid PCR-konfiguration, programmering av PCR-cyklern eller provberedning innan analys med pyrosekvensering kan resultera i uteblivna signaler. Utför funktionstest för filterproberna enligt anvisningarna i användarmanualen till PyroMark Q24 (<i>PyroMark Q24 User Manual</i>) och byt ut filterproberna vid behov. Upprepa PCR och analys med pyrosekvensering. |

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* BRAF Pyro Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med resultat från andra kliniska studier och laboratoriestudier.

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENs egenskapsstudier.

Testets egenskaper

LOB och LOD

LOB (limit of blank) och LOD (limit of detection) har fastställts för ett antal mutationer med hjälp av blandningar av plasmider (tabell 10). LOB och LOD fastställdes enligt rekommendationerna i Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". α - och β -fel (falskt positiva respektive falskt negativa resultat) ställdes in på 5 %. LOB-värden representerar den frekvens som mätts upp med ett vildtypsprov. LOD-värden representerar den lägsta signal (uppmätt frekvens) som kan ses som positiv för den respektive mutationen.

Mutationerna (GTG → GGG) och (GTG → GCG) i kodon 600 och (GGA → GAA) i kodon 464

För de här mutationerna var antingen blankmätningar konsekvent nära 0 procentenheter ($n = 72$), vilket resulterade i en icke-gaussisk fördelning, eller så visade mätningar av prover med låga mutationsnivåer en icke-gaussisk fördelning. LOD fastställdes därför med en annan metod, enligt rekommendationerna i CLSI Guideline EP17-A. Den lägsta signalen som indikerar närvaro av en mutation (LOD) i de här positionerna ställdes in på 2 procentenheter över respektive baslinjenivå enligt 95:e percentilen i blankmätningar. Vid analys av ett prov med mutationsnivån som visas inom parentes i tabell 10 gav 95 % av resultaten ($n = 72$) en signal som kan anses vara positiv (\geq LOD).

Tabell 10. LOB och LOD fastställda för specifika mutationer

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (procent-enheter)	LOD (procent-enheter)	COSMIC ID* (V46)
Kodon 600 (GTG), analyserad bakåt (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Kodon 469 (GGA), analyserad bakåt (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Kodon 466 (GGA), analyserad bakåt (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Kodon 464 (GGA), analyserad bakåt (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer som finns på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] Den lägsta mutationsnivån i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \geq LOD.

Obs: De här värdena baseras på körningar där blandningar av plasmider som bar på vildtypssekvensen eller den respektive mutantsekvensen användes som mall för PCR-amplifiering.

Obs: Vi rekommenderar att metodegenskaperna bekräftas i laboratoriet.

Linjäritet

Linjäritet fastställdes med hjälp av blandningar av plasmider som bar på vildtyps- eller mutantsekvensen för mutationen V600E (GTG → GAG) i kodon 600 i BRAF-genen. Plasmiderna blandades i proportioner som gav fyra mutationsnivåer (5, 10, 30 och 50 %). Varje blandning analyserades med tre olika loter av *therascreen* BRAF Pyro Kit i tre pyrosekvenseringskörningar med vardera tre replikat.

Resultaten (n=9 för varje mutationsnivå) analyserades enligt riktlinjen CLSI EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" med programmet Analyse-it[®] Software v2.21 och visas i bild 11 för mutationen V600E (GTG → GAG) i kodon 600.

Resultaten var linjära inom en tillåten icke-linjäritet på 5 procentenheter i det testade intervallet från 5 till 50 % mutationsnivå.

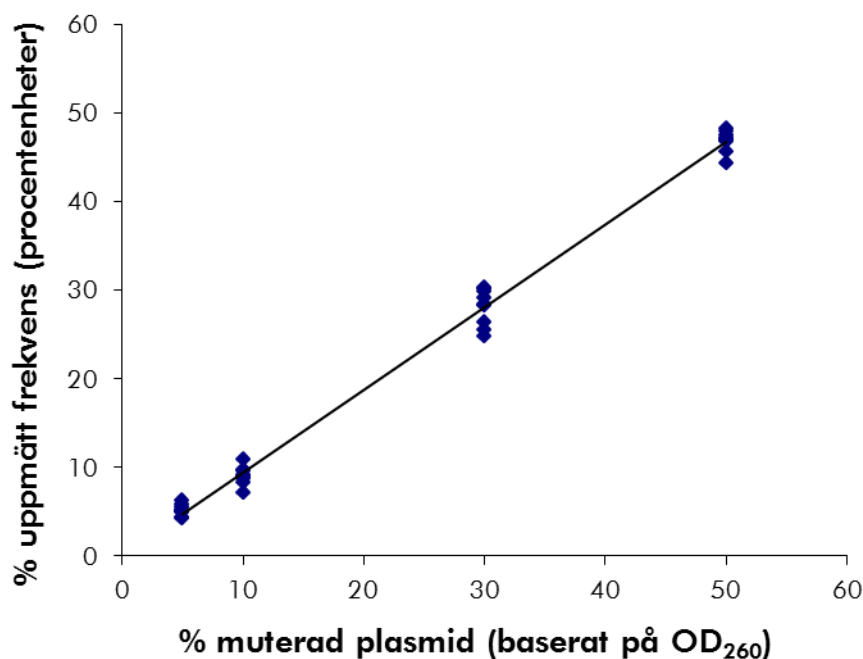


Bild 11. Linjäritet för mutationen V600E (GTG → GAG) i kodon 600.

Precision

Precisionsdata möjliggör bestämning av den totala variabiliteten för analyserna och erhöles på tre olika nivåer genom analys av de ovan nämnda plasmidblandningarna med vardera tre replikat.

Repetierbarhet (variationer inom analyser och mellan batchar) beräknades baserat på data för bestämning av linjäritet (tre körningar på samma dag med olika loter av *therascreen* BRAF Pyro Kit). Variationer inom laboratoriet bestämdes i tre körningar i ett laboratorium på tre olika dagar med olika operatörer, PyroMark Q24-system och loter för *therascreen* BRAF Pyro Kit. Reproducerbarhet (variationer mellan laboratorier) beräknades av två körningar vardera i ett internt och externt laboratorium med hjälp av olika loter av *therascreen* BRAF Pyro Kit.

Uppskattningar av precision uttrycks som standardavvikelse av de uppmätta mutationsfrekvenserna i procentenheter (tabell 11). Repeterbarhet, variationer inom laboratoriet och reproducerbarhet för mutationen V600E (GTG → GAG) i kodon 600 var 0,6–2,1, 0,7–1,8 respektive 0,8–2,1 procentenheter i det uppmätta intervallet på 5–50 % mutationsnivå.

Tabell 11. Linjäritet för mutationen V600E (GTG → GAG) i kodon 600*

% muterad plasmid [†]	Repetierbarhet		Variationer inom laboratoriet		Reproducerbarhet	
	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD	Medelvärde	SD
5	5,2	0,6	4,4	0,7	5,1	0,8
10	9,1	1,0	9,6	1,0	9,6	1,3
30	28,1	2,1	27,9	1,8	28,3	2,1
50	46,9	1,2	46,3	1,5	47,9	1,7

* Alla värden ges som procentenheter. SD: standardavvikelse (n=9).

[†] Baserat på OD₂₆₀-mätning.

Diagnostisk utvärdering

therascreen BRAF Pyro Kit utvärderades i jämförelse med Sanger-sekvensering. DNA extraherades från 100 formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) tumörprover från hud och analyserades med avseende på mutationer i kodon 600 och kodonerna 464–469.

DNA isolerades med hjälp av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Analys med pyrosekvensering utfördes med *therascreen* BRAF Pyro Kit på PyroMark Q24-systemet och Sanger-sekvensering på ABI™ 3130 Genetic Analyser.

Av de 100 prover som analyserades kunde mutationsstatus för kodon 600 och kodonerna 464–469 bestämmas i alla prover med Sanger-sekvensering respektive i 99 prover med *therascreen* BRAF Pyro Kit (tabell 12 och tabell 13).

I fyra av de 100 proverna detekterades en V600E (GTG → GAG)-mutation med Sanger-sekvensering. Tre av dessa prover hade identiska resultat med *therascreen* BRAF Pyro Kit, och ett prov misslyckades i analys med pyro-

sekvensering för kodon 600 på grund av låga toppar. I analysen för kodonerna 464–469 hade det här provet tillräckliga men avsevärt lägre toppar än andra prover, vilket indikerar en låg kvalitetsnivå på DNA. Ingen av de sällsynta mutationerna i kodonerna 464–469 detekterades av någon av metoderna.

Om det prov som misslyckades med en metod räknades bort visade *therascreen* BRAF Pyro Kit och Sanger-sekvensering 100 % överensstämmande resultat för både kodon 600 och kodonerna 464–469 (tabell 12 och 13).

Tabell 12. Resultat för de analyserade hudtumörproverna för kodon 600

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Vildtyp	Okänd	Totalt
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutant	3	0	0	3
	Vildtyp	0	96	0	96
	Okänd	1	0	0	1
	Totalt	4	96	0	100

Tabell 13. Resultat för de analyserade hudtumörproverna för kodonerna 464–469

		Sanger-sekvensering			
		Mutant	Vildtyp	Okänd	Totalt
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit	Mutant	0	0	0	0
	Vildtyp	0	99	0	99
	Okänd	0	1	0	1
	Totalt	0	99	0	100

Obs: I alla körningar för bestämning av testegenskaper låg signalen på över 30 RLU, rutinmässigt erhållet från 10 ng DNA isolerat från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) vävnad. Data för pyrosekvensering analyserades med BRAF Plug-in Report.

Referenser

QIAGEN upprätthåller en stor, uppdaterad databas online med vetenskapliga publikationer där QIAGEN-produkter avhandlas. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelords-sökning eller genom att specificera applikation, forskningsområde, titel, etc.

En fullständig lista med referenser finns i QIAGENS referensdatabas online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller hos QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test

<N>



Används senast



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Innehåller



Antal



Natriumhydroxid



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support eller ringa någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Bilaga A: Konfigurera *therascreen* BRAF Pyro-analyser

Om BRAF Plug-in Report har installerats är de fördefinierade analyskonfigurationerna för kodonerna 600 och 464–469 tillgängliga i snabbmenyn i programmet PyroMark Q24 under sökvägen "Example Files/PyroMark Setups/BRAF". Följande steg behöver inte utföras. BRAF Plug-in Report kan fås via e-post från pyro.plugin@qiagen.com.

Vi rekommenderar att du använder BRAF Plug-in Report framför manuell analys. Komplexa mutationer kan inte läggas till manuellt i en "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) och måste analyseras med hjälp av plugin-rapporten. Efter installation av plugin-rapporten eller varje gång ett nytt program har installerats eller uppgraderats på datorn ska du verifiera att plugin-rapporten fungerar korrekt enligt anvisningarna i BRAF Plug-In Quick Guide.

Om BRAF Plug-in Report inte har installerats måste analysfilen konfigureras manuellt innan *therascreen* BRAF Pyro-analysen körs första gången. Konfigurera analysen för BRAF kodon 600 och kodonerna 464–469 med hjälp av programmet PyroMark Q24 enligt beskrivningen nedan.

Procedur

BRAF kodon 600

A1. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).

A2. Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera):

CWCTGTAGC

Obs: Den mest frekventa mutationen i kodon 600 är en GTG → GAG-mutation i nukleotid 1799 (andra positionen).

"Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) kan också ändras efter körningen för att analysera mutationer på andra positioner.

Om du vill kontrollera huruvida mutationer finns närvarande i nukleotid 1798 (första positionen) ändrar du "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) till följande sekvens:

CAYTGTAGC

Om ytterligare sällsynta mutationer i nukleotid 1799 ska kontrolleras, bör "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) **CVCTGTAGC** också analyseras.

Obs: Se till att tröskelvärdet för enskild höjdtopp är satt till 30 RLU.

Obs: De komplexa mutationerna i BRAF kodon 600 kan inte analyseras med AQ-analysen i programmet PyroMark Q24 med hjälp av "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera). Vi rekommenderar att BRAF Plug-in Report används för analys av komplexa mutationer i kodon 600.

A3. Ange följande "Dispensation Order" (Dispenseringsordning)

manuellt:

TCGTATCTGTAG

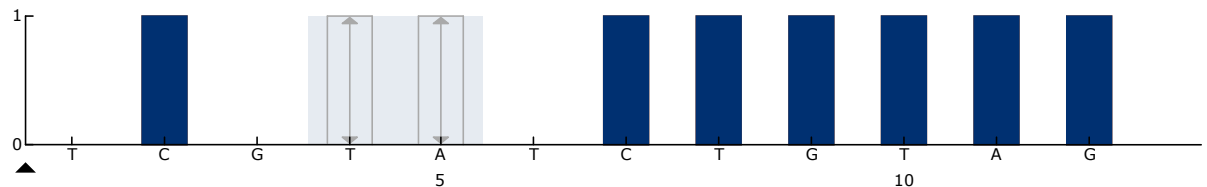


Bild 12. Histogram för kodon 600 (nukleotid 1799) med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CWCTGTAGC.

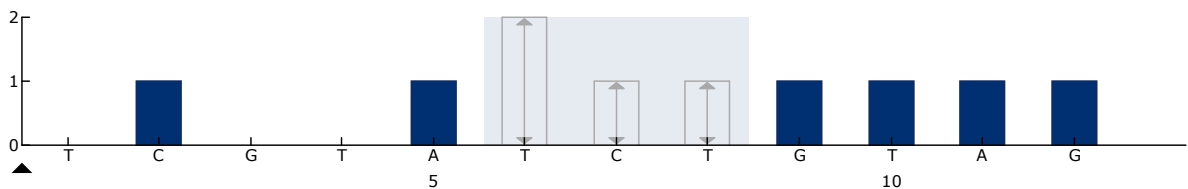


Bild 13. Histogram för kodon 600 (nukleotid 1798) med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CAYTGTAGC.

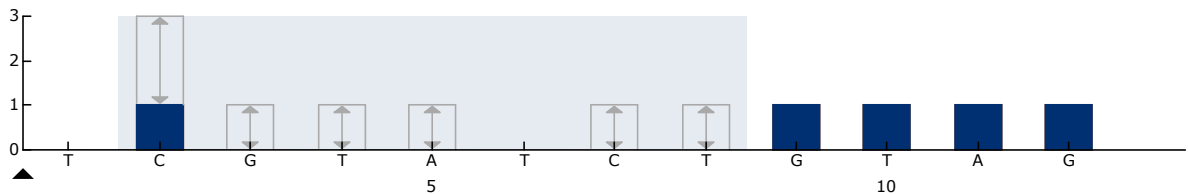


Bild 14. Histogram för kodon 600 (nukleotid 1799) med "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera) CVCTGTAGC.

A4. Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.

A5. Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "BRAFcodon 600".

BRAF-kodoner 464–469

A1. Klicka på  i verktygsfältet och välj "New AQ Assay" (Ny AQ-analys).

A2. Ange följande sekvens i "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera):

CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

Obs: Den komplexa mutationen i BRAF kodon 469 kan inte analyseras med AQ-analysen i programmet PyroMark Q24 med hjälp av "Sequence to Analyze" (Sekvens att analysera). Vi rekommenderar att BRAF Plug-in Report används för analys av den komplexa mutationen i kodon 469.

A3. Ange följande "Dispensation Order" (Dispenseringsordning) manuellt.

AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAAC

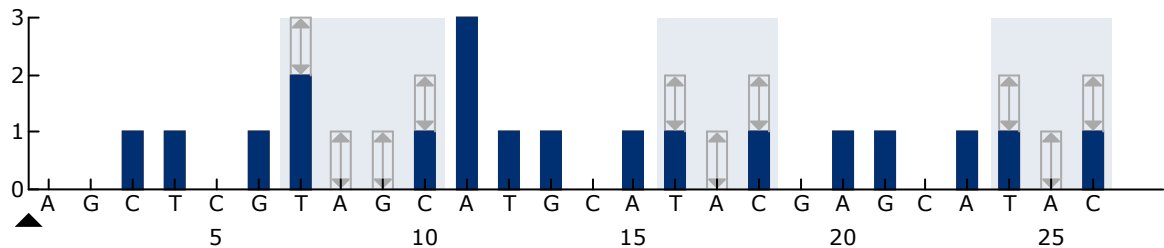



Bild 15. Histogram för kodonerna 464–469 (nukleotiderna 1391 [kodon 464], 1397 [kodon 466] och 1406 [kodon 469]).

A4. Klicka på fliken "Analysis Parameters" (Analysparametrar) och öka "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Tröskelvärde för topphöjd som krävs för godkänd kvalitet:) till 30.

A5. Klicka på  i verktygsfältet och spara analysen som "BRAFcodons 464-469".

Bilaga B: Tömma avfallsbehållaren och trågen

WARNING 	Farliga kemikalier Denatureringslösningen som används tillsammans med vakuumstationen innehåller natriumhydroxid som irriterar ögonen och huden. Använd alltid säkerhetsglasögon, handskar och en labbrock. Ansvarig person (t.ex. laboratoriechef) måste vidta nödvändiga åtgärder för att se till att den omgivande arbetsplatsen är säker och att användarna av instrumentet inte utsätts för farliga nivåer av giftiga ämnen (kemiska eller biologiska) enligt definitionen i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDSs) eller dokumenten OSHA,* ACGIH, [†] eller COSHH [‡] . Ventilation för ångor och kassering av avfall måste ske i enlighet med alla nationella och lokala hälso- och säkerhetsföreskrifter och lagar.
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (USA)

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

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

Följ gällande nationella och regionala föreskrifter för miljövänlig hantering av laboratorieavfall.

Viktigt att tänka på före start

- För det här protokollet krävs höggradigt rent vatten.

Procedur

B1. Se till att det inte finns något vakuum i vakuumverktyget. Kontrollera att vakuomet är stängt (Off) och att vakuumpumpen är avstängd.

B2. Kassera eventuell kvarvarande lösning i trågen.

B3. Skölj trågen med höggradigt rent vatten eller byt ut dem vid behov.

B4. Töm avfallsbehållaren.

Obs: Locket kan tas bort utan att koppla loss slangarna.

B5. Om vakuumstationen måste rengöras (t.ex. från damm eller spill) följer du instruktionerna i användarmanualen till PyroMark Q24 (PyroMark Q24 User Manual).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	För 24 reaktioner på PyroMark Q24-system: Seq-primrar, PCR-primrar, ometylerat kontroll-DNA, PyroMark PCR-huvudmix, CoralLoad-koncentrat, PyroMark bindningsbuffert, PyroMark hybridiseringsbuffert, PyroMark denatureringslösning, PyroMark tvättbuffert, enzymblandning, substratblandning, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP och H ₂ O	971470
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001513
PyroMark Q24	Sekvensbaserad detektionsplattform för pyrosekvensering av 24 prover parallellt	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuumbastation (220 V) för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuumbastation (220 V) för beredning av 24 prover parallellt, från PCR-produkt till enkelsträngad mall	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Tillämpningsprogram	9019063
PyroMark Q24 Software	Analysprogram	9019062

* Endast UK

† Övriga världen

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Tillbehör		
PyroMark Q24 Plate (100)	Reaktionsplatta för sekvensering med 24 brunnar	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kassetter för dosering av nukleotider och reagenser	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Återanvändbara filterprober för vakuumstation PyroMark Q96 och Q24	979010
PyroMark Control Oligo	För installationskontroll av system	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	För bekräftelse av systemegenskaper	979304
Relaterade produkter		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: 50 QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar, uppsamlingsrör (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	För 48 beredningar: reagenskassetter (Tissue), engångs-pipettspetsar med filter, engångs-spetshållare, provrör (2 ml), elueringsrör (1,5 ml), buffert G2, proteinas K	953034

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

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

Registrerade namn, varumärken etc. som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

Ansvarsfriskrivning

Ska inte användas vid bestämning av risk för utveckling av endometrios

Avtal om begränsad licens

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av *therascreen* BRAF Pyro Kit godkänner följande villkor:

1. *therascreen* BRAF Pyro Kit får endast användas i enlighet med *Handbok för theascreen BRAF Pyro Kit* och endast med de komponenter som finns i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i *Handbok för theascreen BRAF Pyro Kit* och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kiten och/eller någon av deras komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, med ensamrätt.

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

