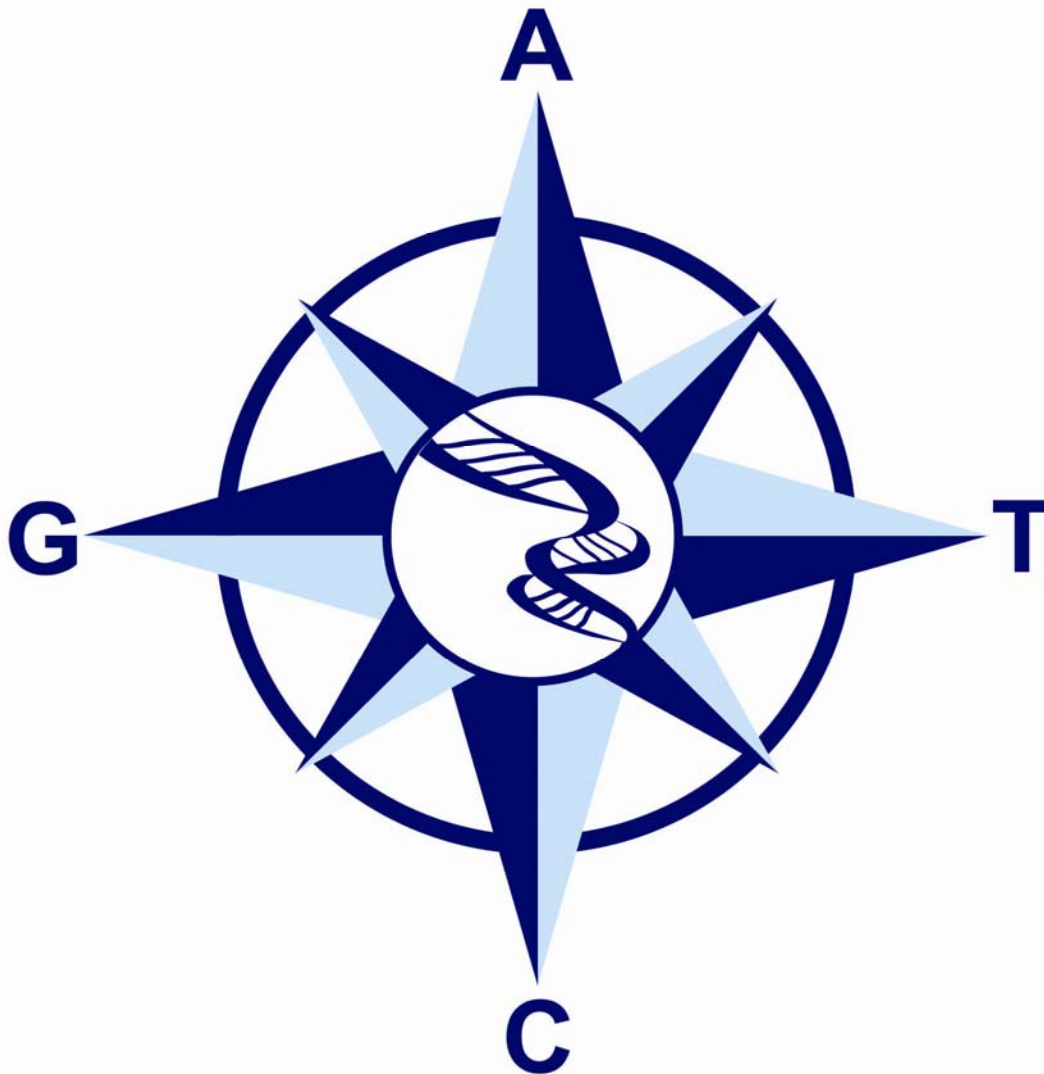




**Pokyny pro použití soupravy pro
detekci mutací
SURVEYOR® Scan K-RAS
Mutation Detection Kit
CE IVD User Guide**



Obsah

Výrobce	2
SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	2
Určené použití	2
Indikace pro použití	2
Principy testu pro detekci mutací SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection	2
K-RAS	2
SURVEYOR Nuclease	3
Původ kontrol v soupravě	4
Komponenty	4
Počet vzorků, které lze testovat pomocí jedné soupravy	5
Sekvenování DNA	5
Další požadované vybavení a reagensie	5
Skladování a životnost po prvním použití soupravy	6
Varování a preventivní opatření	6
Získání primárního vzorku, manipulace a uložení	6
Detekce somatické mutace pomocí soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i> - přehled	6
Pokyny krok za krokem	7
Instalace protokolu K-RAS v systému WAVE HS system	7
WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace patron (Navigator Software) aplikace se SURVEYOR Nuclease	7
WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace termostatu	7
Systém WAVE HT HS před analýzou vzorku K-RAS	7
Templát	7
Amplifikační protokol	8
Kontrola kvality produktů PCR	10
Digesce SURVEYOR Nuclease	10
Poznámky k činnosti	11
Kontrolní postupy	11
Kontrola kvality se soupravou SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	11
Použití kontrolních plazmidových DNA obsahujících K-RAS	11
Interpretace výsledků	12
Analýza exonu 2 genu K-RAS s použitím SURVEYOR Nuclease	12
Ukázky výsledků	13
Popis funkce	14
Úroveň detekce soupravou SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	14
Mutace G12S v exonu 2 K-RAS Hladina sérií ředění pro detekci	15
Mutace G13D v exonu 2 K-RAS Hladina sérií ředění pro detekci	16
Interpretace nízkoprocentních vzorků mutací	17
Různá omezení v postupu testování	18
Reference na literaturu	18
Příloha A	20
Řešení problémů	20
Příloha B	23
WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace patron (Navigator Software) pro aplikace se SURVEYOR Nuclease	23
Parametry WAVE HS System pro protokol K-RAS	25
Gradient pro exon 2 K-RAS	29
Údržba DNASep HT Cartridges	30
Promývací postup	30
Provádění REVERSE HOT WASH patrony DNASep HT Cartridge	30
Kontaktní údaje	31
Obchodní známky a autorská práva	31

Výrobce

Soupravu pro detekci mutací SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* vyrábí společnost Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA. Tel: 1-402-452-5400. Autorizovaným zástupcem pro Evropské společenství je Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, UK. Tel +44-141-892-8800.

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD*

Tato souprava je dodávána jako jedna krabice obsahující níže uvedené komponenty. Tyto pokyny pro použití lze získat stažením.

Určené použití

Pouze pro profesionální použití. Souprava pro detekci mutací od společnosti Transgenomic SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* je *in vitro* diagnostický test, který detekuje mutace exonu 2 genu K-RAS. Mutace v kodonech 12 a 13 jsou indikovány odlišnými výsledky testu. Tato souprava je určena pro použití v klinické diagnostické laboratoři příslušně školenými pracovníky provádějícími testování DNA extrahované z tkání zalitých v parafínu a fixovaných formalinem.

Indikace pro použití

Kliničtí pracovníci mohou používat soupravu pro detekci mutací SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* při rozhodování, zda kolorektální karcinom pacienta může nebo nemůže vykazovat odezvu na terapeutické přípravky, které jsou protilátkami vůči EGFR (epidermal growth factor receptor), jako je Vectibix[®] nebo Erbitux[®].

Souprava pro detekci mutací SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* **se nesmí** používat pro diagnózu kolorektálního nebo jiného karcinomu.

Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* indikuje přítomnost mutací exonu 2 genu K-RAS, ale nepotvrzuje sekvenční identitu mutace. Pro potvrzení detekované přesné mutace je třeba použít další analytickou metodu, jako je sekvenování DNA.

Výsledky získané pomocí této soupravy se používají klinickým pracovníkem jako indikace mutačního stavu pacienta. V úvahu je třeba vzít i další klinické faktory a výsledky získané soupravou SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* **nesmí být použity jako jediná metoda při rozhodování týkajícího se jakékoli léčby kolorektálního karcinomu u pacientů.** Konkrétně: vzorky s pozitivním testem na mutaci v genu K-RAS pomocí této soupravy musí být potvrzeny sekvenováním DNA.

Principy testu pro detekci mutací SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection

K-RAS

U nově vyvinutých terapeutických látek cílených na epidermal growth factor receptor (EGFR), jako je cetuximab (Erbitux) a panitumumab (Vectibix) se prokázalo, že jsou účinné proti kolorektálnímu karcinomu. Avšak u některých kolorektálních karcinomů jsou tato léčiva neúčinná. Přibližně 40% kolorektálních nádorů obsahuje mutace genu K-RAS a tyto mutace se uvádějí do souvislosti s nedostatečnou odezvou vůči antagonistům EGFR. Mutační stav genu K-RAS lze tedy použít pro určení, zda nádor bude či nebude vykazovat odezvu na anti-EGFR terapii.

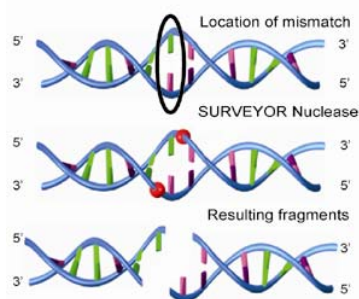
Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* je diagnostická souprava pro detekci všech sekvenčních a malých inzerčních/delečních mutací v exonu 2 genu K-RAS. Pro mutace

exonu 2 v kodonech 12 a 13, které se dávají do souvislosti s nedostatečnou účinností vůči protilátkám k EGFR, se dodávají pozitivní kontroly.

Tato souprava využívá patentově chráněnou SURVEYOR Nuclease a WAVE[®] HS System umožňující jednoduchou a citlivou detekci mutací se schopností detekovat směs 1% mutantu na pozadí 99% nezmutované DNA. Validáční studie ukázaly extrémně vysokou konkordanci se sekvenováním kvalitně charakterizovaných vzorků kolorektálního karcinomu. Navíc digestivní charakteristiky SURVEYOR Nuclease pro kodony 12 a 13 jsou vysoce specifické. Použití soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* sníží pro uživatele nároky na sekvenování, když software pro automatické sekvenování nezjistí přítomnost mutace.

SURVEYOR Nuclease

SURVEYOR Nuclease od společnosti Transgenomic je mismatch - specifická (specifická pro chybné párování) endonukleáza z rostlinné DNA, která skenuje známé i neznámé mutace a polymorfismy v heteroduplexní DNA. Tento enzym štěpí s vysokou specificitou DNA v místech substituce báze chybným párováním a v místech jiných odchylek. Tato DNA endonukleáza štěpí oba řetězce heteroduplexu DNA na straně 3' chybně párovaného místa¹. Rozpoznává se chybné párování vzniklé inzercí/deleci a substitucí bází, avšak účinnost štěpení se mění podle sekvence chybného párování^{1, 2}.



Obrázek 1. Mechanismus účinku SURVEYOR Nuclease.

Endonukleáza rozpoznává chybné párování a provádí štěpení na straně 3' každé báze v chybném párování. Tím je štěpena dvoušrobovice DNA s přesahující jednou bází na konci 3'.

SURVEYOR Nuclease byla použita v širokém rozsahu situací pro přesnou detekci mutací a genetického polymorfismu⁵. SURVEYOR Nuclease byla použita především pro ověření přítomnosti známých mutací v řadě genů souvisejících s karcinomem ledviny³, karcinomem plic^{4, 9, 10,12-15}, karcinomem hlavy a krku⁶, leukémií^{7, 16, 17}, endometriálním karcinomem⁸ a při předpovědi výsledku radioterapie¹¹.

Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* pro systémy WAVE HS Systems byla vyvinuta pro štěpení chybného párování v exonu 2 genu K-RAS s následující analýzou iontové párovací HPLC na reverzní fázi s použitím systémů WAVE HS Systems.

Poznámka: Pro tento test je nutné používat výhradně DNA polymerázu dodávanou v této soupravě.

Poznámka: Promývací postupy doporučené a popsané v těchto pokynech pro použití soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* pro systémy WAVE HS systems a používání patron DNASep[®] HT Cartridges se odlišují od postupů používaných pro standardní procedury WAVE DHPLC. V zájmu zachování optimální funkce systému WAVE HS system dodržujte konkrétní doporučení v těchto pokynech.

V zájmu úspěšného používání této soupravy důrazně doporučujeme, si tuto příručku důkladně přečteli a pozorně postupovali podle pokynů a návodů v ní obsažených. Uživatelé pracující s touto soupravou poprvé by měli provést kontrolní experimenty uvedené v části „Použití K-RAS kontrolní plasmidové DNA“ na straně 11.

Budete-li mít další dotazy nebo budete potřebovat asistenci, zatelefonujte na číslo **+44 (0) 141 892 8800** (v Evropě) a žádejte „podporu K-RAS“. Další možností je poslat nám e-mail na:

SURVEYORscan@transgenomic.com

Původ kontrol v soupravě

Kontroly dodávané s touto soupravou jsou plasmidové klony sekvencí exonu 2 genu K-RAS. Všechny klony byly sekvenovány, aby byla ověřena věrnost jejich sekvence při srovnání s referenční sekvencí NCBI: NG_007524.1.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 byl zkonstruován metodou PCR exonu 2 genu K-RAS ze standardní genomické DNA a klonováním.

K-RAS Positive Control Codon 12 byl zkonstruován místně řízenou mutagenezí K-RAS Control: Wild-Type Exon 2. Sekvenováním DNA bylo potvrzeno, že jediná změna v sekvenci je v kodonu 12, a to GGT>AGT.

K-RAS Positive Control Codon 13 byl zkonstruován místně řízenou mutagenezí K-RAS Control: Wild-Type Exon 2. Sekvenováním DNA bylo potvrzeno, že jediná změna v sekvenci je v kodonu 13, a to GGC>GAC.

V části **Použití K-RAS kontrolní plasmidové DNA** na straně 11 naleznete další podrobnosti k DNA sekvencím kontrol.

Komponenty

Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* se skládá z krabice obsahující 16 zkumavek s reagensii; v každé krabici jsou 4 prázdné otvory.

Katalogové číslo	Komponenta	Souprava pro 100 reakcí (710101-CEIVD) Dodávaný objem
703310	DNA Polymerase (2,5 U/μL)	100 μL
703315	DNA Polymerase 10X PCR Buffer	1000 μL
703065	dNTPs (10 mM)	500 μL
710151F	K-RAS Primer: Exon 2 Forward (10 μM) (2 zkumavky)	2 x 250 μL
710151R	K-RAS Primer: Exon 2 Reverse (10 μM) (2 zkumavky)	2 x 250 μL
710160	SURVEYOR Nuclease W (2 zkumavky)	2 x 105 μL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	105 μL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	105 μL
708027	0.15 M MgCl ₂ Solution	105 μL
708030	Stop Solution	250 μL
710141	K-RAS Control: Wild-Type Exon 2	40 μL
710143	K-RAS Positive Control Codon 12	40 μL
710144	K-RAS Positive Control Codon 13	40 μL

482276-CZ Příručka pro uživatele Lze stáhnout z adresy*
http://www.transgenomic.com/pd/surveyor/SurveyorKRAS_CEIVD_ug.asp

Počet vzorků, které lze testovat pomocí jedné soupravy

Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* je určena pro testování 100 reakcí. Celkový počet vzorků, který lze testovat, závisí na průměrné velikosti dávky vzorků testovaných v jakémkoli čase. Je tomu tak proto, že jedna sada kontrol musí být testována se vzorky v každé dávce vzorků.

Níže uvedená tabulka ukazuje počet vzorků, které lze analyzovat soupravou K-RAS v závislosti na průměrné velikosti dávky. Ten se vypočítává na základě toho, že pro každý běh se vyžadují 4 kontroly a pro soupravu je limit 100 reakcí.

Zvýší-li se velikost dávky, potom se počet vzorků, který lze testovat v jedné dávce, zvýší, a tím se sníží průměrné náklady na reagentie vztahované na jeden vzorek.

Velikost dávky	Počet kontrol + amplikony vzorků	Počet testů/běh	Celkový počet běhů/soupravy	Počet vzorků/soupravy
1	4 + 1	5	20	20
2	4 + 2	6	16	32
3	4 + 3	7	14	42
4	4 + 4	8	12	48
5	4 + 5	9	11	55
9	4 + 9	13	7	63
16	4 + 16	20	5	80
21	4 + 21	25	4	84
29	4 + 29	33	3	87
46	4 + 46	50	2	92
96	4 + 96	100	1	96

Sekvenování DNA

Pro případ potřeby je k dispozici dostatečný počet primerů pro amplifikaci exonu 2 genu K-RAS metodou PCR, které lze rovněž použít při sekvenování DNA všech testovaných vzorků.

Další požadované vybavení a reagentie

Další komponenty a vybavení požadované pro používání soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* zahrnují následující:

WAVE System (model 3500HT nebo model 4500HT), příslušenství WAVE HSD, DNASep HT Cartridge (kat. č. Transgenomic DNA-99-3710), WAVE Optimized® Buffers (Buffer A, Buffer B a Solution D kat. č. Transgenomic 553401, 553402 a 553412 v uvedeném sledu; Syringe Wash Solution [pro model 3500] a HS Staining Solution I kat. č. 553411 a 553442 v uvedeném pořadí), 0,2ml zkumavky pro PCR, 2,0ml mikrocentrifugační zkumavky, mikropipety, pipetové špičky, WAVE DNA Sizing Standard (kat. č. Transgenomic 560078), hmotnostní žebříček 100-bp DNA, voda o jakosti pro postupy v molekulární biologii, led, vortex, mikrocentrifuga, termocykler, agarózové gely a zařízení pro agarózovou gelovou elektroforézu.

Příprava reagentií

Všechny reagentie dodávané v soupravě jsou připravené k použití. Některé komponenty je nutné před použitím rozmrazit, vortexovat nebo odstředit v mikrocentrifuze; příslušné podrobnosti naleznete

v níže uvedeném postupu testování. Spojením reagensů se získají hlavní směsi a reakční směsi; úplné podrobnosti jsou uvedené v níže popsaném postupu testování – viz strana 6.

Skladování a životnost po prvním použití soupravy

Souprava se skladuje až do použití při teplotě mezi $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazáku s konstantní teplotou. Poznamenejte si datum vypršení životnosti u každé dodané soupravy. Po vypršení data životnosti soupravu nepoužívejte.

Směs se SURVEYOR Nuclease připravená v kroku 7 postupu digesce SURVEYOR Nuclease (strana 10) se musí použít okamžitě, neboť SURVEYOR Nuclease W se v přítomnosti ostatních složek reakční směsi SURVEYOR Nuclease během času deaktivuje.

Varování a preventivní opatření

Žádná z reagensů v této soupravě není v dodaném množství nebezpečná pro lidské zdraví. Bezpečnostní list od společnosti Transgenomic MSD-710101 lze stáhnout z adresy

<http://www.transgenomic.com/lib/msds/710101.pdf>

Souprava neobsahuje žádné látky lidského nebo živočišného původu, které by mohly způsobit infekci.

Tuto soupravu mohou používat pouze osoby, které jsou vyškolené v příslušných laboratorních metodách. Při práci s komponentami této soupravy vždy používejte laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranu očí. Po použití soupravy zlikvidujte komponenty jako nemocniční odpad v souladu s místními pravidly a předpisy.

Alikvotní množství reagensů odpipetovaná ze zkumavek v soupravě jsou určena pouze pro jedno použití. Pro komponenty soupravy byla provedena validace, že zůstávají stabilní i po 25 cyklech zmrazení-rozmrazení. Po překročení tohoto počtu cyklů zmrazení-rozmrazení soupravu nepoužívejte.

Získání primárního vzorku, manipulace a uložení

Pro soupravu SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* se vyžaduje DNA extrahovaná ze vzorků nádoru kolorektálního karcinomu zalitých v parafínu a fixovaných formalínem. Aby byla splněna kritéria kvality související s úspěšným použitím soupravy, musí extrahovaná DNA splňovat následující požadavky:

- Q-PCR extrahované DNA musí ukázat, že je k dispozici amplifikovatelný templát.
- Poměr absorbance 260/280 musí být $>1,80$.
- Koncentrace templátu pro každý vzorek musí být $25\text{ ng}/\mu\text{L}$.

Vzorky extrahované DNA, které nejsou určeny pro bezprostřední provedení analýzy touto soupravou, musí být skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Postup provedení testu

Detekce somatické mutace pomocí soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* - přehled

Detekce mutace a potvrzení nukleázou SURVEYOR Nuclease zahrnuje čtyři kroky:

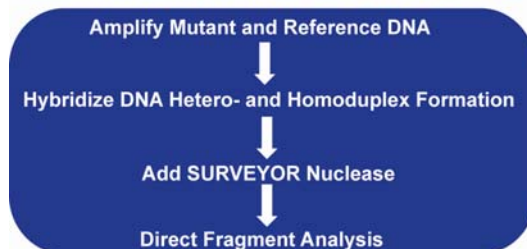
Step 1 - Připravte PCR amplikony z mutantní (určené pro test) a normální (referenční) DNA.

Step 2 – V návaznosti na konečný cyklus amplifikace PCR se zahřátím reakční směsi všechny dvojité řetězce rozdělí a poté se pomalu zchladí, aby proběhla optimální tvorba hetero- a homoduplexů.

Step 3 - Ošetřete směs spárovaných heteroduplexů/homoduplexů nukleázou SURVEYOR Nuclease. Samotná referenční DNA, vystavená obdobnému postupu, slouží jako kontrola na pozadí.

Step 4 - Provedte analýzu fragmentů DNA v systému WAVE HS System. Tvorba nových produktů štěpení je v důsledku jednoho nebo více chybných párování indikována přítomností dodatečných píků. Retenční doby produktů štěpení indikují velikost fragmentů a tím i umístění chybného nebo více chybných párování.

Mutation Detection in Four Easy Steps



Pokyny krok za krokem

Instalace protokolu K-RAS v WAVE HS System

Stažením protokolu K-RAS exon 2 CE pro WAVE HS system do Navigator™ Software lze provést rychlé a snadné nastavení. Otevřete:

<http://www.transgenomic.com/sp/sw/nav/K-RAS%20Protocol/K-RAS%20ProtocolCEIVD.asp>

a postupujte podle pokynů pro instalaci protokolu K-RAS a ověřovacích postupů.

WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace patron (Navigator Software) aplikace se SURVEYOR Nuclease

Viz Příloha B - WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace patron (Navigator Software) pro aplikace se SURVEYOR Nuclease v těchto pokynech pro uživatele.

WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace termostatu

Postupy pro kalibraci termostatu naleznete v uživatelské příručce WAVE Operator's User Manual. **Doporučujeme provádět kalibraci jednou měsíčně.**

Systém WAVE HT HS před analýzou vzorku K-RAS

1. Před během vzorků musí být v gradientu K-RAS proveden běh s WAVE DNA Sizing Standard **Příloha B – Gradient pro exon 2 K-RAS**); tím se zajistí správná funkčnost systému.

Templát

1. U templátové FFPE DNA (izolované z tkání zalitých v parafínu a fixovaných formalínem) proveďte pomocí běžných laboratorních postupů kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení extrahované DNA, aby bylo jisté, že je k dispozici amplifikovatelný templát pro PCR.
2. Poměr absorpance 260/280 musí být >1,80.
3. Pro optimální nastavení PCR musí být pracovní koncentrace templátu pro každý vzorek 25 ng/μl. Je-li třeba, zředte templátovou DNA ve vodě o jakosti pro postupy v molekulární biologii.

Primery

1. Sekvence primerů dodávaných v této soupravě jsou následující:

Amplikon		Sekvence
Exon 2	Přímý	cggGTTTGTATTTAAAAGGTACTGGTGGAGT
	Zpětný	cgggTTTATCTGTATCAAAGAATGGTCCT

POZNÁMKA: Primery obsahují malé svorky GC. 5'-konec exonu 2 je velmi bohatý na AT.

2. Sekvence amplikonů jsou následující:
 - a. Přímé primery jsou zvýrazněny **zeleně**. Zpětné primery jsou zvýrazněny **červeně**. Kódující úseky jsou zvýrazněny **zeleně**. Úseky s nejčastější mutací jsou zvýrazněny **růžově**. Velká písmena bez zvýraznění představují nekódující úseky cDNA.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2

MD Loci: 10428 - 10706

Velikost: 286 bp

cgggtttgtattaaaagggtactggaggagtattgatagtgattaaaccttatgtgacatgttctaataatagtcacatttcattatttt
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA**ACTTGTGGTAGTTGGAGCT**GGTGGCGTA**
GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATC
CAACAATAGAGgtaaatctgttttaatatgcatattactgggtg**aggaccattcttggatacagataaa**cccg

Amplifikační protokol

1. K dispozici je předmíchaný roztok dNTP (kat. č. 703065) s 10mM celkovou pracovní koncentrací deoxynucleotidů (2,5 mM na každý ze čtyř deoxynukleotidů).
2. Přímé a zpětné primery (kat. č. 710151F a 710151R v uvedeném sledu) pro každý amplikon jsou dodávány v koncentraci 10 µM.
3. Vyjměte 10 µM primery, 10mM předmíchaný roztok dNTP a DNA Polymerase 10X PCR Buffer (kat. č. 703315) z mrazáku a nechte roztát na ledu.
4. Na ledu připravte hlavní směs.
5. Při přípravě hlavní směsi pro exon 2 genu K-RAS použijte jako vodítko následující tabulku:

Počet reakcí:	1.00
Výpočet objemu:	
Objem vody (µL)	33.0**
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	5.0
dNTPs (µL)	4.0
K-RAS Primer: Exon 2 Forward (µL)	2.5
K-RAS Primer: Exon 2 Reverse (µL)	2.5
DNA Polymerase (µL)	1.0
Celkový objem hlavní směsi:	48.0
Objem přidané extrahované DNA (µL při 25 ng/µL)	2.0**
Celkový objem reakce PCR:	50.0

**Poznámka: při koncentraci extrahované DNA <25 ng/µL zvyšte úměrně objem extrahované DNA a rovněž snižte o stejné množství objem vody v hlavní směsi tak, aby výsledný objem činil 50 µL na jednu reakci. Ve všech vzorcích připravených s použitím této hlavní směsi bude muset být extrahovaná DNA zředěna na přibližně stejnou nejnižší hladinu koncentrace. Nedoporučuje se používat extrahovanou DNA o koncentraci <5 ng/µL.

6. Vypočítejte požadované objemy pro hlavní směs vynásobením objemů uvedených v tabulce výše celkovým počtem vzorků, který bude analyzován a přičtením 4 dalších reakcí pro kontroly.
7. Označte 0,2 mL zkumavky pro PCR nebo jamky na 96-jamkové desce údajem příslušného vzorku.

8. Označte 2,0 mL centrifugační zkumavky pro přípravu hlavní směsi.
 9. Přidejte do 2,0ml centrifugační zkumavky s označením „hlavní směs“ požadovaný objem vody o jakosti pro postupy v molekulární biologii.
 10. Vortexujte DNA Polymerase 10X PCR Buffer přibližně 10 sek.
 11. Přidejte do 2,0 mL centrifugační zkumavky požadované množství DNA Polymerase 10X PCR Buffer.
 12. Vortexujte předmíchaný pracovní roztok 10,0 mM dNTP přibližně 10 sek.
 13. Přidejte do 2,0 mL centrifugační zkumavky požadovaný objem předmíchaného pracovního roztoku 10,0 mM dNTP.
 14. Přidejte požadovaný objem K-RAS Primer: Exon 2 Forward do 2,0 mL centrifugační zkumavky.
 15. Přidejte požadovaný objem K-RAS Primer: Exon 2 Reverse do 2,0 mL centrifugační zkumavky.
 16. Vyjměte DNA Polymerase (kat. č. 703310) z mrazáku.
 17. Odstředte DNA Polymerase přibližně 10 sek.
 18. Vortexujte DNA Polymerase přibližně 10 sek.
 19. Přidejte požadované množství DNA Polymerase do 2,0 mL centrifugační zkumavky.
 20. Uzavřete 2,0 mL centrifugační zkumavku obsahující hlavní směs.
 21. Před použitím 2,0 mL centrifugační zkumavku vortexujte přibližně 30 sek.
 22. Až do použití uložte do ledu.
 23. Odpipetujte 48,0 µL hlavní směsi do příslušných jamek; používáte-li jednonábovou pipetu, vyměňujte špičky pipetu mezi jednotlivými jamkami. Používáte-li opakovací pipetu, nesmí mezi jamkami docházet k úniku nebo rozstříku. Uložte desku na led.
 24. Do příslušných jamek přidejte 2,0 µL templátové DNA jednotlivých vzorků, kontrolní templátové DNA (kat. č. 710140, 710143, 710144) a volné kontroly templátu (vodu).
 25. Po dokončení pipetování zakryjte každou jamku pásem s 8 kryty (používáte-li 96-jamkovou desku) nebo uzavřete 0,2 mL zkumavky pro PCR. Zkontrolujte, že kryty jsou bezpečně utěsněny.
 26. Vortexujte (při přibližně poloviční rychlosti) 30 sek.
- Zkontrolujte desky nebo 0,2 mL zkumavky pro PCR. Přesvědčte se, že roztok je na dně jamek. Není-li tomu tak, proveďte odstředění. Po odstředění snižte rychlost vortexu a zamíchejte po dobu přibližně 15 sek.

Program thermocyklieru pro amplifikační protokol

1. Pro amplifikaci a tvorbu heteroduplexů použijte následující protokol pro termocyklier:

Počáteční denaturace	95 °C	5 min
15 cyklů dosednutí	95 °C	30 sek
	62 °C, -0,5 °C/cyklus	30 sek
	72 °C	25 sek
30 cyklů amplifikace	95 °C	30 sek
	55 °C	30 sek
	72 °C	25 sek
Konečné prodloužení	72 °C	2 min
Tvorba heteroduplexů	95 °C	2 min
	4 °C	Ponechat

Kontrola kvality produktů PCR

1. Před digescí nukleázou SURVEYOR Nuclease se kontroluje kvalita a kvantita amplikonů gelovou elektroforézou nebo systémem WAVE DHPLC.
2. Provedte analýzu alikvotního podílu produktu PCR spolu s různým množstvím hmotnostního žebříčku 100-bp DNA.
3. S použitím žebříčku provedte odhad koncentrace amplifikované DNA.
4. Měl by být zřetelný pouze jediný proužek >20 ng/μL odpovídající hlavnímu produktu.
5. Je-li přítomno více proužků, zkontrolujte, že byla dostačující kvalita vstupní templátové DNA (viz **Příloha A – Řešení problémů**).
6. Nemá-li být přítomen žádný produkt, zkontrolujte, že byla dostačující kvalita vstupní templátové DNA (viz **Příloha A – Řešení problémů**). Splňuje-li kvalita požadované specifikace, zvýšte objem templátu na 4,0 μL/ 50 μL reakci (snižte množství vody na reakci na 31,0 μL).
7. V kontrolním vzorku bez templátu by neměly být viditelné žádné produkty PCR. Jsou-li produkty DNA zřetelné, je pravděpodobná kontaminace této kontroly; viz strana 20 v Řešení problémů.

Digestce SURVEYOR Nuclease

1. Je-li PCR vzorku dostatečné kvality a kvantity, provedte digestivní reakci se SURVEYOR Nuclease podle níže uvedeného popisu.
2. Rozmrzte na ledu 0.15 M MgCl₂ Solution a SURVEYOR Enhancer Cofactor.
3. Do nové 0,2 mL zkumavky pro PCR nebo do jamky na 96-jamkové desce přidejte 10,0 μL z každého vzorku.
4. Při práci s násobnými vzorky připravte čerstvou směs 0.15 M MgCl₂ Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 a SURVEYOR Nuclease W (směs SURVEYOR Nuclease).
 - a. Před použitím každou reagentii odstředte.
 - b. Před pipetováním jemně vortexujte.
 - c. Pro každou digesci přidejte do 0,2 mL (nebo větší) mikrocentrifugační zkumavky pro PCR následující komponenty.
 - 1,0 μL 0.15 M MgCl₂ Solution (kat. č. 708027)
 - 1,0 μL SURVEYOR Enhancer Cofactor (kat. č. 708049)
 - 1,0 μL SURVEYOR Enhancer W2 (kat. č. 710161)
 - 2,0 μL SURVEYOR Nuclease W (kat. č. 710160)
5. Odstředte směs SURVEYOR Nuclease po dobu 10 sek. při nízké rychlosti.
6. Mírně vortexujte směs SURVEYOR Nuclease po dobu 10 sek. při nízké rychlosti.
7. Až do použití uložte směs SURVEYOR Nuclease do ledu.
8. Odpipetujte ke každým 10,0 μL hybridizovaného PCR produktu 5,0 μL alikvot směsi SURVEYOR Nuclease.
9. Po dokončení pipetování odstředte 0,2 mL PCR zkumavky nebo 96-jamkovou desku s digestivní směsí po dobu 10 sek.
10. Mírně vortexujte 0,2 mL PCR zkumavky nebo 96-jamkovou desku se vzorky po dobu 10 sek.
11. Inkubujte při 42 °C po dobu **30 min**.
12. Do každé zkumavky nebo jamky přidejte 1,0 μL Stop Solution (kat. č. 708030) a mírně vortexujte (celkový reakční objem se SURVEYOR Nuclease je 16,0 μL).
13. S použitím specifikovaných gradientů nastříkněte 8,0 μL každé digescí směsi. Viz **Analýza exonu 2 K-RAS s použitím SURVEYOR Nuclease** na straně 12.

Poznámka: Směs se SURVEYOR Nuclease připravená v kroku 7 se musí použít okamžitě, neboť SURVEYOR Nuclease W se v přítomnosti ostatních složek reakční směsi SURVEYOR Nuclease deaktivuje.

Poznámky k činnosti

Souprava je určena pro analýzu mutací ve 100 vzorcích; na obrázku 11 je uveden přehled 96-jamkové desky s kontrolami a s 92 vzorky. Lze analyzovat i menší dávky vzorků, ale kontroly a WAVE DNA Sizing Standard musí být používány při každém běhu. Souprava obsahuje dostatečný materiál pro kontrolu všech kombinací používaných velikostí dávek vzorků.

Zpracování vzorků musí být všeobecně prováděno od zahájení až do konce podle popisu v této příručce pro uživatele. Dojde-li před dokončením celého postupu k zastavení zpracování vzorku, je nutné DNA uložit do -20 °C až do provedení dalšího kroku. Avšak zmrazené vzorky nemají být vystavovány opakovanému zmrazování a rozmrazování a DNA amplifikovaná pomocí PCR ani produkty digesce SURVEYOR Nuclease by neměly být skladovány při -20 °C po delší dobu (>1 týden).

Kontrolní postupy

Kontrola kvality se soupravou SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD*

Souprava obsahuje kontrolní plazmidovou DNA pro provádění kontroly kvality během specifických kroků testovacího postupu. V amplifikačním protokolu (strana 8) se pomocí těchto kontrol ověřuje, zda je hlavní směs správně připravena a zda amplifikace probíhá správně. Přidává-li se voda místo templátové DNA, nedoporučují se pro kontrolu možné kontaminace komponent soupravy templátovou DNA používat žádné templátové kontroly.

Během kroku digesce SURVEYOR Nuclease umožňují amplikony z těchto tří kontrolních plazmidových DNA účinnou kontrolu, zda podmínky při štěpící reakci (příprava směsi SURVEYOR Nuclease a podmínky inkubace) byly uspokojivé. Ve fázi analýzy umožňují křivky digestovaných kontrolních amplikonů ve WAVE System vodítko k tomu, kde dojde k eluci mutací v kodonu 12 nebo 13, a to i při jejich nízké koncentraci (viz Obr. 3 a 4).

Pokud PCR amplikony nebo fragmenty ze štěpení SURVEYOR Nuclease odvozené z kontrolních plazmidových DNA neodpovídají výsledkům uvedeným v části Kontrola kvality produktů PCR (strana 10) ani v části Ukázky výsledků (strana 13), prostudujte Řešení problémů v Příloze A nebo se před dalšími kroky v analýze vzorků pacientů obraťte na technickou podporu společnosti Transgenomic.

Použití kontrolních plazmidových DNA obsahujících K-RAS

Součástí soupravy jsou tři kontrolní DNA:

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2; kat. č. 710141

K-RAS Positive Control Codon 12; kat. č. 710143

K-RAS Positive Control Codon 13; kat. č. 710144

Tyto kontrolní DNA jsou plasmidy s inzerty. Každá pozitivní kontrola obsahuje dva plasmidy: směs v poměru 50:50 standardní kontroly a mutovaného klonu lišícího se od standardního typu v jediném páru bází. Kontroly se dodávají v samostatných lahvičkách o koncentraci 2,5 ng/μL.

Přímé a zpětné primery pro amplifikaci pomocí PCR se dodávají v soupravě samostatně. Sekvence standardní kontroly a pozitivních kontrol jsou uvedeny níže.

Přímé primery jsou zvýrazněny **zeleně**. Zpětné primery jsou zvýrazněny **červeně**. Kódující úseky jsou zvýrazněny **zeleně**. Rozdíly v sekvencích pozitivních kontrol jsou zvýrazněny **růžově**. Velká písmena bez zvýraznění představují nekódující úseky cDNA.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2

MD Loci: 10428 - 10706

Velikost: 286 bp

```
cgggtttgtattaaaggctactggaggattttgatagtgattaaccttatgttgacatgttctaatatagtcacatttcattat  
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGT  
GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATC  
CAACAATAGAGgtaaatctgttttaaatgcatattactgggcaggaccattctttgatacagataaa
```

K-RAS Positive Control Codon 12

MD Loci: 10428 - 10706

Velikost: 286 bp

```
cgggtttgtattaaaggctactggaggattttgatagtgattaaccttatgttgacatgttctaatatagtcacatttcattat  
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT[G/A]GTGGCG  
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT  
CCAACAATAGAGgtaaatctgttttaaatgcatattactgggcaggaccattctttgatacagataaa
```

K-RAS Positive Control Codon 13

MD Loci: 10428 - 10706

Velikost: 286 bp

```
cgggtttgtattaaaggctactggaggattttgatagtgattaaccttatgttgacatgttctaatatagtcacatttcattat  
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTG[G/A]CG  
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT  
CCAACAATAGAGgtaaatctgttttaaatgcatattactgggcaggaccattctttgatacagataaa
```

Během používání těchto kontrol dodržujte pokyny uvedené v amplifikačním protokolu (strana 8), v digesci SURVEYOR Nuclease (strana 10) a v analýze exonu 2 genu K-RAS Exon 2 s použitím SURVEYOR Nuclease (strana 12).

**PŘI PRVNÍM POUŽITÍ SOUPRAVY DŮRAZNĚ DOPORUČUJEME PROVÉST PŘED
TESTOVÁNÍM GENOMICKÝCH VZORKŮ NEJPRVE EXPERIMENTY SE SAMOTNÝMI
KONTROLAMI**

Interpretace výsledků

Analýza exonu 2 genu K-RAS s použitím SURVEYOR Nuclease

Stažením K-RAS exon 2 CE Protocol Template pro WAVE HS System do Navigator Software lze provést rychlé a snadné nastavení. Otevřete

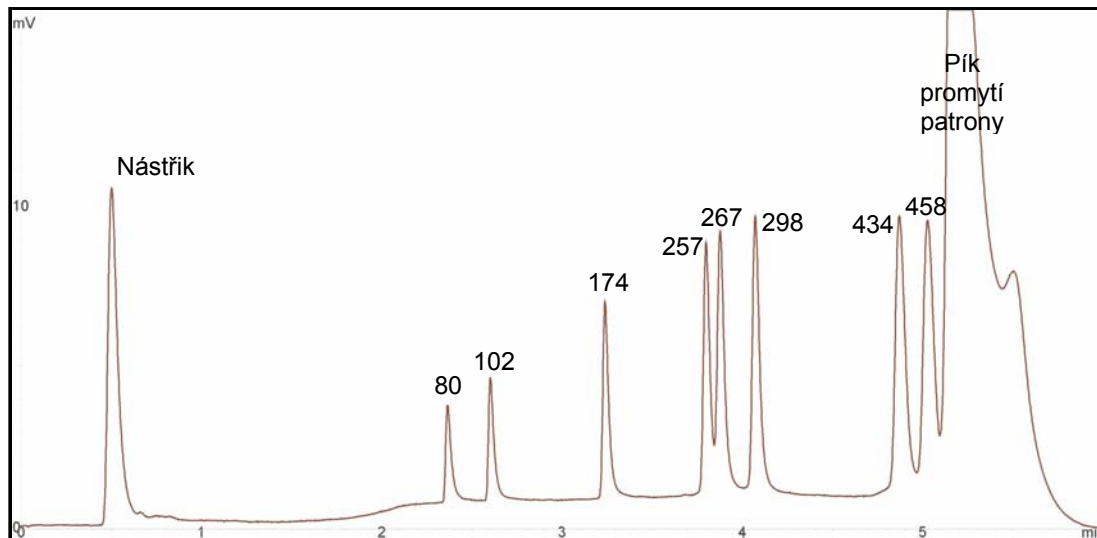
<http://www.transgenomic.com/sp/sw/nav/K-RAS%20Protocol/K-RAS%20ProtocolCEIVD.asp>

a postupujte podle pokynů pro instalaci protokolu K-RAS a pro ověřovací postupy.

1. Parametry pro gradientovou predikci pro manuální nastavení WAVE HS System naleznete v **Příloze B: Parametry WAVE HS System pro protokol K-RAS**.

Poznámka: doporučujeme používat přednostně instalovaný protokol místo manuálního nastavení.

2. Pro účely srovnání/kontroly vždy provádějte digesci SURVEYOR Nuclease u obou kontrol (standardní a pozitivní) a u vzorku DNA a stejným způsobem v nosiči WAVE System.
3. Pro ověření správné funkce WAVE System lze také před analýzou vzorku provést test s WAVE DNA Sizing Standard (kat. č. 560078). S použitím gradientu exonu 2 K-RAS je třeba provést prázdný běh (nástřik 0 μ L). Poté je třeba provést nástřik 8 μ L WAVE DNA Sizing Standard do gradientu exonu 2 K-RAS – viz **Obrázek 2** ukazující předpokládané výsledky.

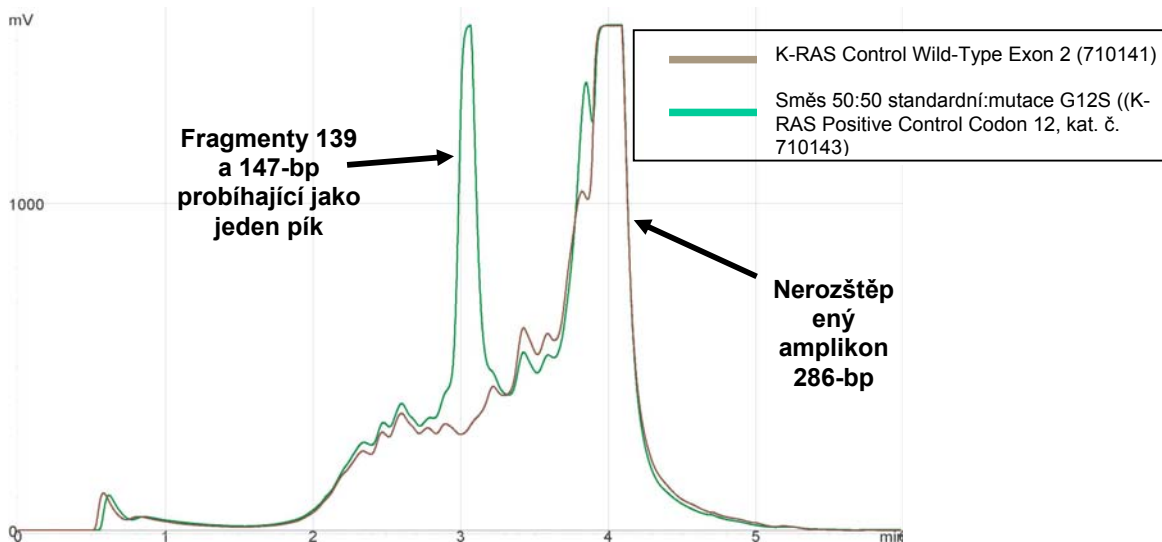


Obrázek 2 Nástržik WAVE DNA Sizing Standard s použitím gradientu exonu 2 K-RAS (detekce pomocí UV). Velikosti fragmentů jsou uvedeny v počtu párů bází.

Podrobnosti ke gradientu exonu 2 K-RAS viz **Příloha B – Gradient pro exon 2 K-RAS**.

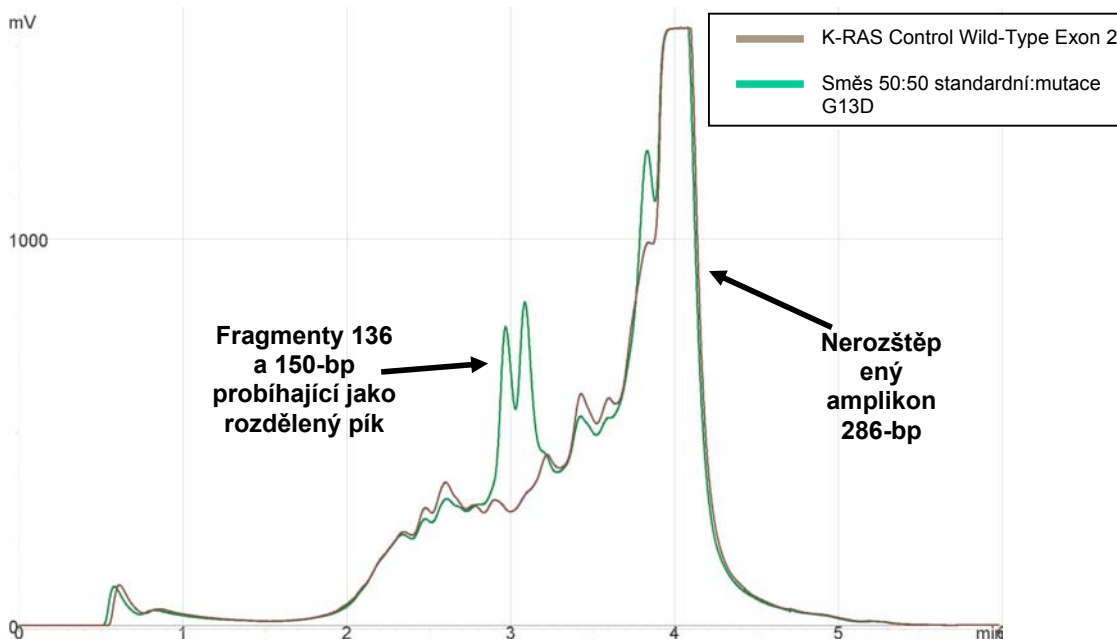
Ukázky výsledků

Na obrázcích 3 a 4 níže jsou znázorněny ukázky výsledků získaných s použitím soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* pro systémy WAVE HS. V těchto ukázkách byl přesně dodržován postup uvedený v části Přehled.



Na obrázku 3 jsou ukázány produkty digescce SURVEYOR Nuclease z kodonu 12 v exonu 2 s 285 páry bází. Heteroduplexy ampliconu se eluují jako jeden pík. Jako templáty v této PCR byly použity K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 a K-RAS Positive Control Codon 12. Tato mutace G12S tvoří heteroduplexy G-T a C-A, z kterých vznikají po digesci SURVEYOR Nuclease fragmenty se 139

a 147 páry bází; píky těchto fragmentů nejsou v tomto gradientu rozlišeny a probíhají jako jeden pik. Produkty digesce byly analyzovány ve WAVE HS System.



Na obrázku 4 jsou ukázány produkty digesce SURVEYOR Nuclease z kodonu 13 v exonu 2 s 286 páry bází. Heteroduplexy ampliconu se eluují jako dvojitý pik. Jako templáty v této PCR byly použity K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 a K-RAS Positive Control Codon 13. Tato mutace G13D tvoří heteroduplexy G-T a C-A, z kterých vznikají po digesci SURVEYOR Nuclease fragmenty se 136 a 150 páry bází; píky těchto fragmentů se oddělují a tvoří charakteristický dvojitý pik. Produkty digesce byly analyzovány ve WAVE HS System.

Tato souprava je vyvinuta tak, aby mutace v kodonu 12 a 13 byly zřetelně a specificky demonstrovány křivkou v WAVE System; to umožňuje uživateli interně validovat možnost dedukce mutačního stavu vzorku bez nutnosti provádět potvrzení sekvenováním.

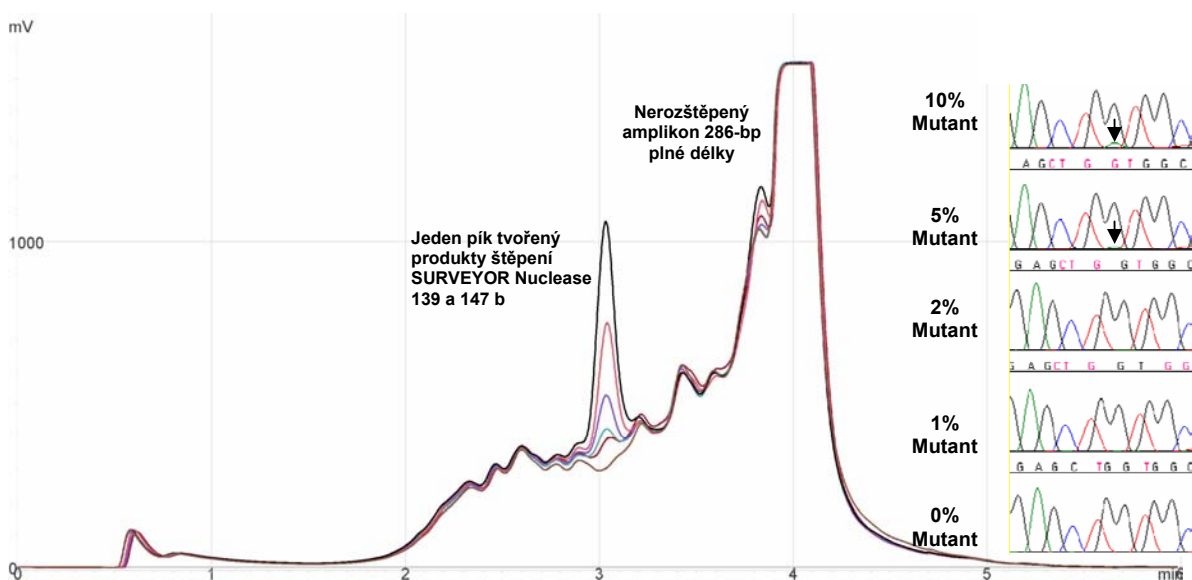
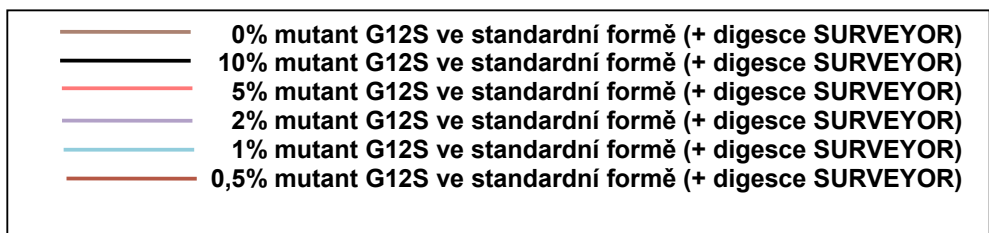
Popis funkce

Úroveň detekce soupravou SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD*

Validace soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* s použitím plasmidových klonů všech známých mutací exonu 2 K-RAS ukázala, že píky vytvořené nukleázou SURVEYOR Nuclease lze detekovat ve směsi 1% mutantu a 99% standardní formy.

Níže uvedené výsledky ukazují křivky sérií ředění ve WAVE HS System pro ukázky mutací v každém z kodonů 12 a 13 a sekvenční elektroferogramy vybraných mutací.

Mutace G12S v exonu 2 K-RAS Hladina sérií ředění pro detekci



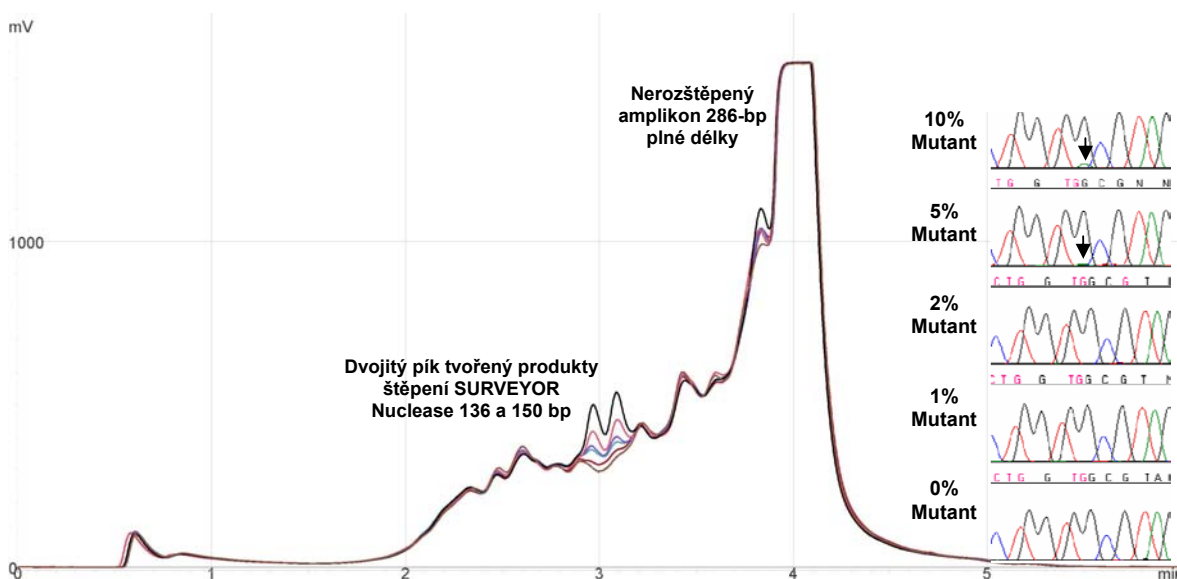
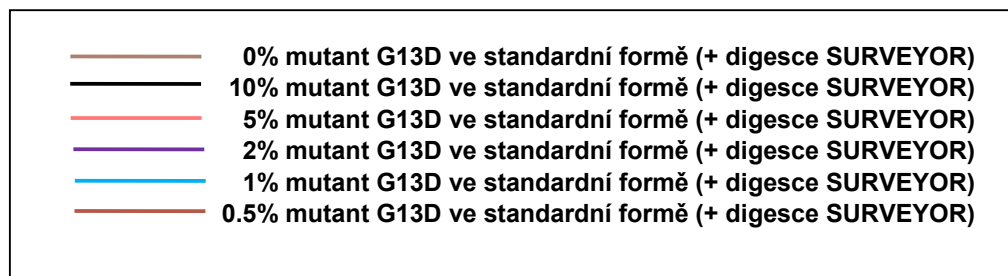
Obrázek 5 Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD Titrace mutace G12S exonu 2 K-RAS

Různé hladiny mutantů byly vytvořeny smícháním K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 (kat. č. 710141) a K-RAS Positive Control Codon 12 (kat. č. 710143) a dále zahřátím a zchlazením směsi, aby došlo k tvorbě heteroduplexů. Tyto směsi byly dále štěpeny SURVEYOR Nuclease a analyzovány ve WAVE 4500 HT HS System. **POZNÁMKA:** pro vytvoření 90% standardní formy a 10% je připravena směs 80% kat. č. 710141 a 20% kat. č. 710143 (viz strana 11). Vzhledem k tomu, že mutace G12S je umístěna v blízkosti středu ampliconu exonu 2, oba produkty štěpení SURVEYOR Nuclease mají podobnou retenční dobu a tvoří jeden pík. Většina směsi ampliconů je tvořena standardními homoduplexy, které nejsou štěpeny SURVEYOR Nuclease. Limit detekce ampliconu mutantu G12S je 1% se SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD + WAVE HS System.

Limit detekce výsledků sekvencování pro mutaci G12S exonu 2 K-RAS

Electroferogramy ukazují výsledky sekvencování produktů PCR analyzovaných SURVEYOR Nuclease. Automatické sekvencování přímého a zpětného řetězce často selhává v detekci mutace G12S ve směsi se standardní formou pod 10%. Společně s výsledky SURVEYOR Nuclease lze důvěryhodněji interpretovat elektroferogramy sekvencování 5% mutantů pro kodon 12.

Mutace G13D v exonu 2 K-RAS Hladina sérií ředění pro detekci



Obrázek 6 Souprava SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* Titrace mutace G13D exonu 2 K-RAS

Různé hladiny mutantů byly vytvořeny smícháním K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 (PN 710141) a K-RAS Positive Control Codon 13 (PN 710144) a dále zahřátím a zchlazením směsi, aby došlo k tvorbě heteroduplexů. Tyto směsi byly dále štěpeny SURVEYOR Nuclease a analyzovány ve WAVE 4500 HT HS System. **POZNÁMKA:** pro vytvoření 90% standardní formy a 10% je připravena směs 80% PN 710141 a 20% PN 710143 (viz strana 11). Vzhledem k tomu, že mutace G13D je v mírně větší vzdálenosti od středu ampliconu exonu 2 než mutace G12S (viz Obrázek 5), oba produkty štěpení SURVEYOR Nuclease mají různé retenční doby a tvoří dvojitý pik. Většina směsi ampliconů je tvořena standardními homoduplexy, které nejsou štěpeny SURVEYOR Nuclease. Limit detekce ampliconu mutantu G13D je 1% se SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* a WAVE HS System.

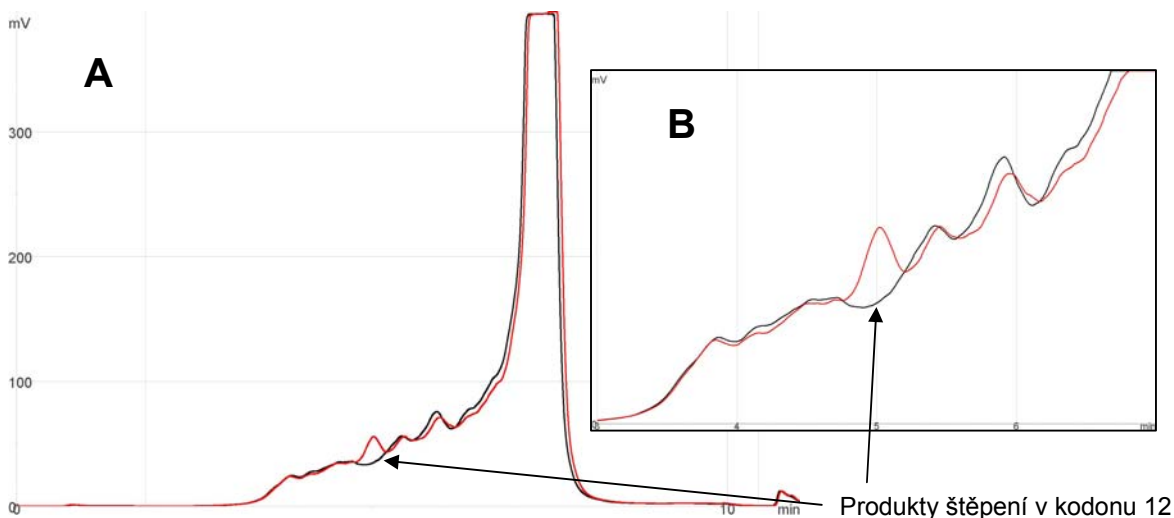
Limit detekce výsledků sekvencování pro mutaci G13DS exonu 2 K-RAS

Pro srovnání jsou ukázány elektroferogramy znázorňující výsledky sekvencování produktů PCR pro různé hladiny mutantů. Automatické sekvencování přímého a zpětného řetězce často selhává v detekci mutace G13D ve směsi se standardní formou pod 10%. Společně s výsledky SURVEYOR Nuclease lze důvěryhodněji interpretovat elektroferogramy sekvencování směsi standardní formy:mutant 90:10 (5% mutace) pro kodon 13 obsahující mutaci.

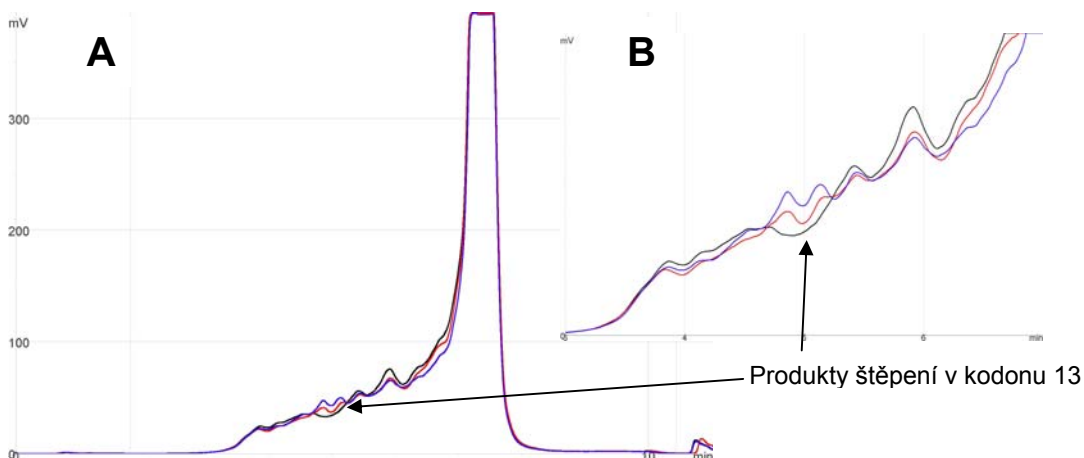
Interpretace nízkoprocenních vzorků mutací

Ačkoli interní a externí validační studie SURVEYOR Scan K-RAS Kit ukázaly, že detekce mutací při 1% standardní formy je realistická, ale závisí na kvalitě základní linie dané čáry. Reakce genomické DNA a PCR o nízké kvalitě, nedostatečné postupy promývání kolony DNASep (viz Promývací postup na straně 30) a neoptimální nastavení WAVE System mohou vést ke vzniku nepravidelné základní linie a učinit rozlišování menších píků nad základní linií obtížnějším.

Křivky znázorněné níže (Obrázky 7 a 8) ukazují rozšířené oblasti křivek s nízkou hladinou mutací a základní linie negativní kontroly.



Obrázek 7 Detekce nízké hladiny mutace v kodonu 12. Červená čára = vzorek s mutací v kodonu 12 o nízké hladině. Černá čára je standardní kontrola. Obrázek 7B je zvětšením oblasti znázorňující produkty štěpení SURVEYOR Nuclease. Základní šum s amplitudními píky podobajícími se píkům štěpených fragmentů je konzistentní pro testovací i kontrolní čáru.



Obrázek 8 Detekce nízké hladiny mutace v kodonu 13. Červené a modré čáry = vzorky s mutací v kodonu 13 o nízké hladině. Černá čára je standardní kontrola. Obrázek 8B je zvětšením oblasti znázorňující produkty štěpení SURVEYOR Nuclease. Základní šum s amplitudními píky podobajícími se píkům štěpených fragmentů je konzistentní pro testovací i kontrolní čáru.

Nastanou-li pochybnosti o přítomnosti či nepřítomnosti píků z digesce SURVEYOR Nuclease, potom doporučujeme opakovat analýzu vzorku s použitím templátu genomické DNA stejného vzorku. Bude-li přítomnost píků i nadále nejasná, měla by být genomická DNA izolována jako čerstvá a znovu analyzována. Doporučení pro zvýšení poměru signálu vůči šumu zahrnují:

- Výběr vzorků tkání zalitých v parafínu a fixovaných formalínem s vysokou koncentrací nádorových buněk.

- Mikrodisekce pro zvýšení poměru nádorových vůči normálním buňkám.
- Provedení kontroly, zda genomická DNA splňuje požadavky čistoty uvedené v části **Templát** na straně 7.

Nízkoprocenní mutace budou obtížně potvrzitelné sekvenováním DNA.

Různá omezení v postupu testování

Kontaminující látky přenesené ze vzorků zalitých v parafínu a fixovaných formalínem mohou narušovat amplifikaci metodou PCR a postupy digesce SURVEYOR Nuclease. Postupy kontroly kvality uvedenými v části Kontrola kvality produktů PCR na straně 10 se zajistí, že extrahovaná DNA bude vhodná pro použití s touto soupravou.

Tato souprava byla validována pro použití se vzorky získané biopsií kolorektálního karcinomu a zalité v parafínu a fixované formalínem. Není validována pro použití s jinými druhy karcinomů ani pro čerstvé nebo zmrazené vzorky získané biopsií.

Řešení potíží s nestandardními výsledky a podrobnosti k faktorům, které ovlivňují tento test naleznete v části Řešení problémů v příloze A v následujícím textu.

Během práce se soupravou je nutné věnovat pozornost zabránění přenosu křížové kontaminace. Extrémní citlivost metody testování vyžaduje v několika bodech preventivní opatření:

- Manipulaci se vzorky je nutné provádět tak, aby mezi vzorky nemohlo dojít ke křížové kontaminaci
- Během všech kroků testu se s plasmidovými kontrolami v soupravě musí manipulovat odděleně od testovaných vzorků
- Pipetování do 96-jamkových desek nesmí umožňovat kontaminaci sousedících jamek vzorkem, ke které by mohlo dojít vystříknutím během míchání nebo opomenutím vyměňovat špičky pipety.

Reference na literaturu

1. **Mutation detection using SURVEYOR nuclease.** Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. *BioTechniques* 36, 702-707. (2004).
2. Gerard, G.F. and Shi, Y. unpublished observations (2009).
3. **Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors.** Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt LS, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta P, Brennan P, Rothman N, Chow WH, Waldman FM, Moore LE. *Clin Cancer Res.* 14, 4726-34 (2008).
4. **Mutations in the LKB1 tumour suppressor are frequently detected in tumours from Caucasian but not Asian lung cancer patients.** Koivunen JP, Kim J, Lee J, Rogers AM, Park JO, Zhao X, Naoki K, Okamoto I, Nakagawa K, Yeap BY, Meyerson M, Wong KK, Richards WG, Sugarbaker DJ, Johnson BE, Jänne PA. *Br. J. Cancer.* 99, 245-52 (2008).
5. **Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard laboratories.** Tsuji T, Niida Y. *Electrophoresis* 29, 1473-83 (2008).
6. **TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck.** Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. *N. Engl. J. Med.* 357, :2552-61 (2007).
7. **SURVEYOR nuclease-based detection of p53 gene mutations in haematological malignancy.** Mitani N, Niwa Y, Okamoto Y. *Ann. Clin. Biochem. Nov;44(Pt 6):557-9 (2007).*

8. **KIT-negative undifferentiated endometrial sarcoma with the amplified epidermal growth factor receptor gene showing a temporary response to Imatinib mesylate.** Mitsuhashi T, Nakayama M, Sakurai S, Fujimura M, Shimizu Y, Ban S, Ogawa F, Hirose T, Ishihara O, Shimizu M. *Ann. Diagn. Pathol.* 11, 49-54. (2007).
9. **Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR -amplified lung cancer.** Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, Gale CM, Naumov GN, Yeap BY, Jarrell E, Sun J, Tracy S, Zhao X, Heymach JV, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. *J. Clin. Invest.* 116, 2695-2706. (2006).
10. **Erlotinib for frontline treatment of advanced non-small cell lung cancer: a phase II study.** Giaccone G, Gallegos Ruiz M, Le Chevalier T, Thatcher N, Smit E, Rodriguez JA, Jänne P, Oulid-Aissa D, Soria JC. *Clin. Cancer Res.* 12, 6049-6055. (2006).
11. **Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project.** Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, Green S, Haffty B, Drumea K, Leitzin L, Kuten A, Azria D, Ozsahin M, Overgaard J, Andreassen CN, Trop CS, Park J, Rosenstein BS. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65, 646-655. (2006).
12. **Response and resistance in a non-small-cell lung cancer patient with an epidermal growth factor receptor mutation and leptomeningeal metastases treated with high-dose gefitinib.** Jackman DM, Holmes AJ, Lindeman N, Wen PY, Kesari S, Borrás AM, Bailey C, de Jong F, Jänne PA, Johnson BE. *J. Clin. Oncol.* 24, 4517-4520. (2006).
13. **Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with Gefitinib or Erlotinib.** Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, Bell DW, Huberman MS, Halmos B, Rabin MS, Haber DA, Lynch TJ, Meyerson M, Johnson BE, Janne PA. *Clin. Cancer Res.* 12, 3908-3914. (2006).
14. **A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening.** Janne PA, Borrás AM, Kuang Y, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H, Lindeman N, Lee JC, Halmos B, Maher EA, Distel RJ, Meyerson M, Johnson BE. *Clin. Cancer Res.* 12, 751-758. (2006).
15. **Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors.** Jänne PA, Johnson BE. *Clin. Cancer Res.* 12, 4416s-4420s. (2006).
16. **Mutation analysis of hCDC4 in AML cells identifies a new intronic polymorphism.** Nowak D, Mossner M, Baldus CD, Hopfer O, Hofmann WK. *Int. J. Med. Sci.* 3, 148-151. (2006).
17. **Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation.** Gotlib J, Berube C, Growney JD, Chen CC, George TI, Williams C, Kajiguchi T, Ruan J, Lilleberg SL, Durocher JA, Lichy JH, Wang Y, Cohen PS, Arber DA, Heinrich MC, Neckers L, Galli SJ, Gilliland DG, Coutre SE. *Blood* 106, 2865-2870. (2005).
18. **Genetic variance detection using SURVEYOR Nuclease.** Gerard GF, Shandilya H, Qiu P, Shi Y, Lo J. In Genetic Variance Detection - Technologies for Pharmacogenomics (ed. Hecker KH) DNA Press, Eagleville, PA, pp. 95 – 129. (2006).

Příloha A

Řešení problémů

Efektivní použití soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* závisí na úspěšném dokončení celé řady kroků. Jedním z nejdůležitějších kroků je amplifikace metodou PCR, která musí vést k tvorbě specifické DNA o jednotné velikosti a v dostatečném množství, aby byla po hybridizaci a štěpení detekovatelná. To závisí na kvalitě původního vzorku. Provádění testu s použitím DNA, která nesplňuje kritéria kvality a kvantitativnosti, se nedoporučuje.

Poznámka: Používáte-li SURVEYOR Nuclease poprvé, proveďte experimenty v části **Použití kontrolní plasmidové DNA s K-RAS** (strana 11) až po prostudování části Pokyny krok za krokem (str. 7). Před kontaktováním technické podpory společnosti Transgenomic mějte výsledky získané pomocí kontrolní plasmidové DNA s K-RAS u sebe.

Tato část Řešení problémů obsahuje seznam potíží, se kterými se můžete setkat při používání soupravy SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* a také návrhy pro jejich řešení.

Problém 1 – nízký výtěžek PCR nebo žádný produkt PCR

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Nízká kvalita templátové DNA	Opakujte purifikaci DNA; ověřte používanou purifikační metodu.
Termocycler není zkalibrován	Zkontrolujte kalibraci termocykleru
Není dostatek templátu	Zvyšte množství templátu.

Poznámka: Je nutné používat vysoce kvalitní DNA z tkání zalitých v parafínu a fixovaných formalínem. Podle měření absorbance při 260 nm, musí mít DNA koncentraci 25 ng/μl, absorbanční poměr při 260/280 nm >1,8 a čistotu >90% DNA (tj. neobsahovat kontaminaci většiny tRNA a rRNA na základě pozorování agarózového gelu). Vzorky DNA skladujte při -20 °C.

Analýza templátu DNA extrahované z tkání zalitých v parafínu vyžaduje některá předběžná opatření. Extrahovanou DNA lze ošetřit uracil DNA glykosylázou a tím zabránit amplifikaci fragmentů DNA obsahujících deaminovaná C residua. Často dochází k tomu, že vysoký podíl materiálu extrahovaného z tkání zalitých v parafínu a adsorbujícího při A₂₆₀ není během PCR správně amplifikován. Použití většího množství zahajovací DNA často napomůže tvorbě vhodného produktu amplifikace.

Problém 2 – Násobné produkty PCR

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Příliš nízká teplota párování	Zkontrolujte kalibraci termocykleru

Poznámka: Metoda PCR by měla vytvořit vysoký výtěžek (>20 ng/μl) **JEDINÉHO** amplifikovaného druhu přesné velikosti. **Pro PCR se musí používat DNA Polymerase a DNA Polymerase 10X PCR Buffer dodávané s touto soupravou.** Amplikony z kontrol musí být digestovány pomocí SURVEYOR Nuclease a jejich průběh nesmí být při vizuálním srovnávání profilů chromatogramu narušován falešným šumem na pozadí (viz **Ukázky výsledků** na str. 13, Obr. 3 - 4). Před digescí zkontrolujte všechny produkty amplifikované DNA gelovou elektroforézou nebo systémem WAVE HPLC, abyste si byli jisti přítomností jednoho druhu o předpokládané velikosti.

Problém 3 – Po působení SURVEYOR Nuclease na heteroduplexy nejsou pozorovány žádné produkty štěpení

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Podíl cíle chybného párování je příliš nízký	Ověřte test pomocí kontrol.
Neefektivní tvorba heteroduplexů	Dodržujte správný postup pro hybridizaci. Pro digesci SURVEYOR Nuclease používejte čerstvě hybridizovanou DNA.
Neaktivní SURVEYOR Nuclease	Pro ověření funkčnosti enzymu proveďte kontrolní reakci.

Poznámka: SURVEYOR Nuclease převážně štěpí v místech s chybným párováním v heteroduplexech. Podíl heteroduplexu vůči homoduplexu v hybridizovaném vzorku určuje digestivní signál SURVEYOR Nuclease. Je-li ve vzorku genomické DNA přítomna mutace K-RAS v nízké koncentraci, signál může být příliš nízký na to, aby vytvořil pozitivní výsledek.

Důležité je zajistit zahrnutí kroku hybridizace do programu termocyklieru (viz **Protokol pro amplifikaci** na str. 9), aby byla maximalizována účinnost tvorby heteroduplexu. Heteroduplexy se během standardních reakcí PCR tvoří velmi neefektivně.

Poznámka: poměr signálu vůči šumu je všeobecně dosti vysoký pro detekci mutací přítomných v nízkém procentu celkového templátu DNA; je možné detekovat 1% až 2% mutantní DNA. Na obrázcích 5 a 6 (str. 15-16) je ukázána detekce mutací přítomných v kodonech 12 a 13 exonu 2 K-RAS (2-18% heteroduplex) WAVE HS System. Obrázky 3-4 (str. 13-14) ukazují produkty digesce vzniklé z homoduplexní a heteroduplexní pozitivní kontrolní DNA K-RAS (obsažené v soupravě) ve WAVE HS System. Lze zřetelně pozorovat produkty specifického štěpení mutací jako dva nové píky o předpokládaných velikostech, které lze odhadnout v porovnání s velikostním markerem DNA.

Pozor: komerčně dostupné pufrы pro PCR mají výrazně rozdílný obsah a složení často není dodavatelem definováno. Některé pufrы **NEJSOU** kompatibilní se SURVEYOR Nuclease vzhledem k pH nebo k přítomnosti přísad, povrchově aktivních činidel a jiných přidaných složek. **NEPOUŽÍVEJTE** žádnou jinou polymerázu ani **10X pufr pro polymerázu než ty, které jsou dodávány v soupravě.**

Problém 4 – Silné pozadí po působení SURVEYOR Nuclease

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Neoptimální hybridizace	Učiňte následující: 1. Zkontrolujte, zda koncentrace DNA je v rozsahu >25 ng/μL. 2. Zopakujte hybridizaci, pozorně dodržujte postup hybridizace.
Příliš nízké množství DNA	Ověřte výtěžek a kvalitu templátové DNA
Nespecifické produkty PCR	Ověřte výtěžek a kvalitu templátové DNA
SURVEYOR Enhancer W2 a/nebo SURVEYOR Enhancer Cofactor ztratily aktivitu	Zkontrolujte datum vypršení soupravy.

POZNÁMKA: SURVEYOR Nuclease někdy štípe dvoušroubovici DNA na jednom vlákně v náhodných místech, což vyvolává vznik silného pozadí po digesci¹⁸. Tato činnost je potlačována SURVEYOR Enhancer W2 a SURVEYOR Enhancer Cofactor, aniž by došlo k negativnímu ovlivnění reakce štěpení v místě chybného párování. Zesilovač SURVEYOR W2 a kofaktor jsou obsaženy v soupravě a tyto je třeba vždy používat.

Zatímco dochází k tomuto štěpení na jednom vlákně, tvoří se menší píky a srovnávání kontrolních produktů digesce homoduplexů s produkty digesce vzorku umožní jejich rozlišení a normalizaci pomocí Navigator Software.

Problém 5 – Píky po digesci SURVEYOR Nuclease u negativních kontrol

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Kontaminace obsahu soupravy aplikony K-RAS nebo plasmidovými kontrolami.	Zlikvidujte všechny komponenty ze soupravy a použijte novou soupravu. Obraťte se technickou podporu společnosti Transgenomic a poradte se o možných příčinách a zdrojích kontaminace.

Problém 6 – Horní části píků po digesci SURVEYOR Nuclease jsou na fluorescenční křivce systému WAVE HSD uťaty

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Detektor o vysoké citlivosti obsahuje interní zpětnovazební algoritmus, který monitoruje množství světla procházející průtokovou komůrkou. Čím více světla projde průtokovou komůrkou, tím je nižší hodnota clony (mV), ale současně je vyšší citlivost.	Tento problém lze vyřešit změnou emisní vlnové délky, avšak za cenu ztráty citlivosti. Doporučujeme použít chromatografickou křivku UV detektoru. Jsou-li křivky fluorescenčního detektoru v chromatogramu uťaté, potom UV křivka ukáže jasný a čitelný signál. Viz ukázky na Obr. 9a a 9b níže. Další možností je nový nástřik menšího objemu vzorku a tím se sníží intenzita fluorescenčního signálu.



Obrázky 9a a 9b. Jsou-li píky při používání HSD Fluorescent Detector uťaté, lze pro analýzu vzorku použít výstup z UV Detector

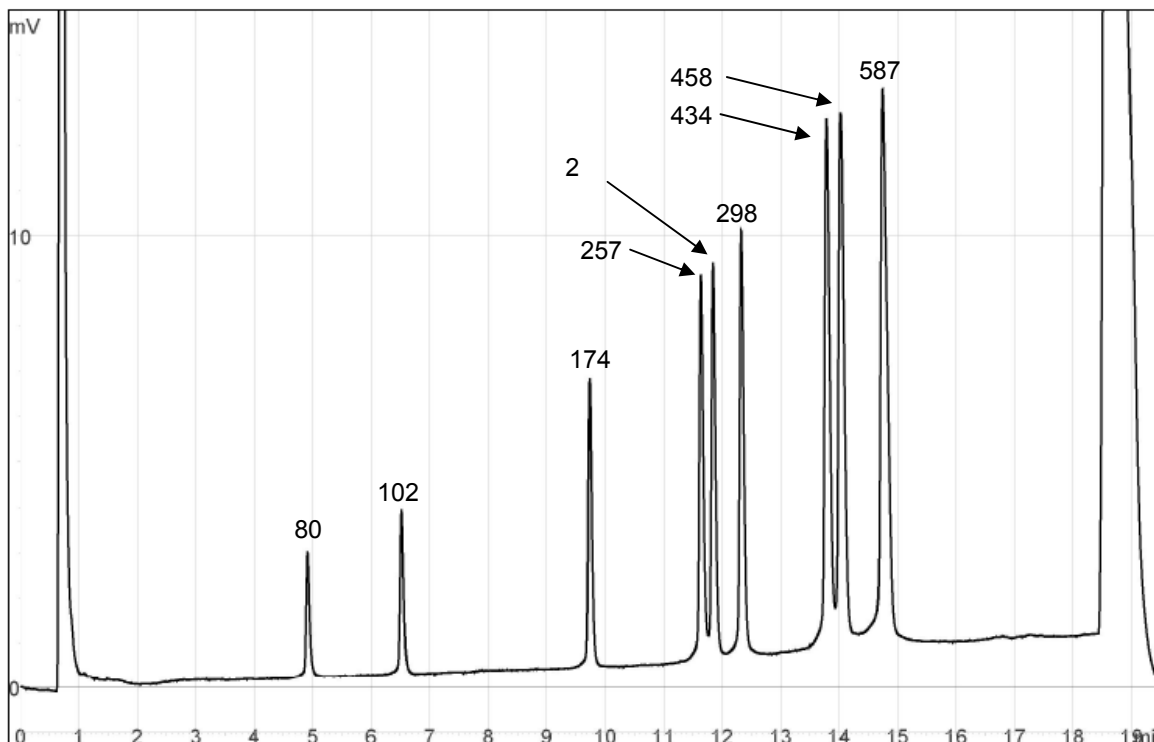
Výše znázorněné křivky představují výstup pro vzorky ze stejné genomické DNA z Fluorescent (9a) a z UV (9b) Detectors. Červená křivka na obou obrázcích představuje vzorek s mutací G12V; černá čára představuje standardní referenční vzorek. Vysoké množství vpravené DNA a analyzované s použitím fluorescenčního detektoru na Obr. 9a tvoří uťaté píky jak pro homoduplexní, tak i pro produkty digesce SURVEYOR Nuclease. Příslušná křivka UV detektoru znázorňuje píky z digesce SURVEYOR Nuclease zřetelně a stejně tak i homoduplexní píky.

Příloha B

WAVE System POČÁTEČNÍ nastavení/kalibrace patron (Navigator Software) pro aplikace se SURVEYOR Nuclease

1. Používejte pouze WAVE Optimized buffers.
2. Vypusťte Buffers A a B spolu se Solution D.
3. Naplňte nastříkovací stříkačku (přední panel ve verzi 3500, přes software ve verzi 4500).
4. Naplňte čerpadlo HSD.
5. V položce nabídky Setup (Nastavení) v rozbalovací liště s nabídkou zvolte Module Setup (Nastavení modulu).
6. V poli instrument (přístroj) zvýrazněte UV detector (UV detektor).
7. Ověřte, že vlnová délka detektoru je nastavena na 260 nm.
8. V poli instrument (přístroj) zvýrazněte fluorescence detector (fluorescenční detektor).
9. Ověřte, že budící vlnová délka detektoru je nastavena na 492 nm a emisní vlnová délka je nastavena na 526 nm (HS Staining Solution I).
10. Vytvořte nový projekt (je-li požadován) nebo otevřete stávající projekt na rozbalovací liště s nabídkou v Navigator Software.
11. Byl-li vytvořen nový projekt, je třeba vytvořit i nový nosič pro vzorky (ověřte, že je zvolen správný typ nosiče).
12. S použitím universal linear application type vytvořte dva prázdné nástřiky.
 - a. Klepnutím levým tlačítkem myši na lahvičku 96 ji zvýrazněte (pokud se používá 96-well tray type).
 - b. Klepnutím pravým tlačítkem na lahvičku otevřete injection page.
 - c. Změňte application type na universal linear.
 - d. Změňte volbu čištění na fast clean (rychlé čištění) (je-li aktuální) nebo active clean (aktivní čištění).
 - e. Ověřte, že teplota v termostatu během postupu je 50,0 °C.
 - f. Změňte objem na 0 µL.
 - g. Změňte počet nástřiků na 2.
 - h. Levým tlačítkem myši klepněte na tlačítko [Generate] (Generovat) ve spodní levé části.
13. Spusťte nástřiky.
14. Vytvořte tři 5 µL nástřiky WAVE DNA Sizing Standard (Katalogové číslo od Transgenomic 560078) s použitím univerzálního lineárního aplikačního typu.
 - a. Umístěte vzorek WAVE DNA Sizing Standard do 0,2 mL zkumavky pro PCR v pozici 96.
 - b. Klepnutím levým tlačítkem myši na lahvičku 96 ji zvýrazněte (pokud se používá 96-well tray type).
 - c. Klepnutím pravým tlačítkem na lahvičku otevřete injection page.
 - d. Změňte application type na universal linear.
 - e. Změňte cleaning option na fast clean (rychlé čištění) (je-li aktuální) nebo active clean (aktivní čištění).
 - f. Ověřte, že teplota v termostatu během postupu je 50,0 °C.
 - g. Změňte objem na 5 µL.
 - h. Změňte počet nástřiků na 3.
 - i. Levým tlačítkem myši klepněte na tlačítko [Generate] (Generovat) ve spodní levé části.

15. Spustíte nástřiky.
16. Po dokončení těchto běhů zkontrolujte na chromatogramech stabilitu retenční doby pro píky odpovídající 80 a 587 párům bází.
 - a. Retenční doba 80bp píku a 587bp píku WAVE DNA Sizing Standard musí být mezi jednotlivými běhy v rozmezí 0,1 min.
17. Před během skutečných vzorků proveďte kalibraci patron.
 - a. Na záložce Analysis (Analýza) klepněte na tlačítko [Select Results] (Zvolit výsledky).
 - b. Vyhledejte třetí nástřik WAVE DNA Sizing Standard. S použitím navigace soubory na levé straně otevřete projekt a nosič a poté vyhledejte injection na displeji s nástřiky na pravé straně.
 - c. Zvýrazněte třetí nástřik WAVE DNA Sizing Standard a poté klepněte na tlačítko [Add Selected Results] (Přidat vybrané výsledky).
 - d. Pravým tlačítkem myši klepněte na chromatogram.
 - e. Zvolte [Chart] (Graf).
 - f. Pod možností Peak Labels Option (Označení píků) zvolte Peak Labels Box a s použitím rozbalovací nabídky zvolte [Peak Retention Time] (Retenční doba píků).
 - g. Klepněte na [Apply] (Použít).
 - h. Klepněte na [OK].
 - i. Na liště s nabídkou použijte rozbalovací nabídku Setup (Nastavení) a zvolte [Cartridge Calibration] (Kalibrace patrony).
 - j. Zadejte hodnoty retenčních dob zobrazené na chromatogramu pro příslušné píky WAVE DNA Sizing Standard.
 - k. Zvolte [Plot New Calibration] (Zadat novou kalibraci).
 - l. Zvolte [Accept New Calibration] (Přijmout novou kalibraci).



Obrázek 10. Typická analýza WAVE DNA Sizing Standard s použitím Universal Linear Method Type z Navigator Software (ukázka WAVE 4500 HT HS).

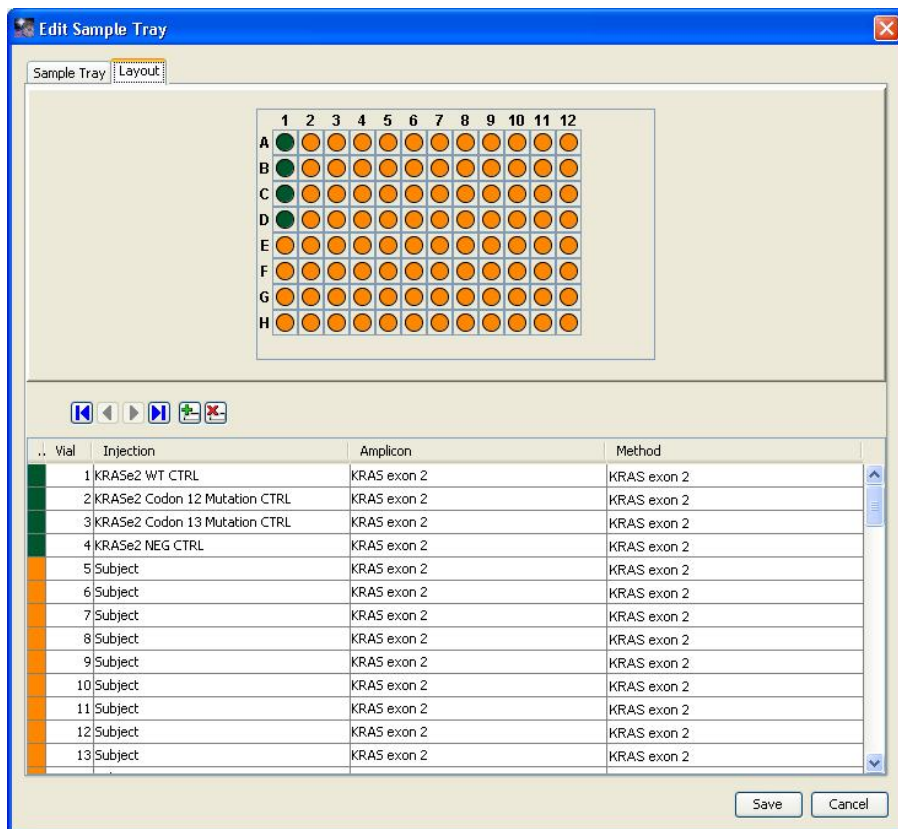
Parametry WAVE HS System pro protokol K-RAS

Doporučujeme stáhnout pro instalaci do Navigator Software K-RAS exon 2 CE Protocol Template. Viz instalační průvodce K-RAS Installation Guide na:

<http://www.transgenomic.com/sp/sw/nav/K-RAS%20Protocol/K-RAS%20ProtocolCEIVD.asp>

Pro manuální nastavení systému WAVE HS System a kontrolu správné instalace K-RAS exon 2 CE Protocol Template jsou důležité následující parametry gradientní predikce:

Flow rate:	1.2 mL/min
Oven Temperature:	45.0 °C
Application Type:	dsDNA multiple
Minutes/100 bp:	0.95
Number of segments:	15
Minimum base pair:	40 bp
Maximum base pair:	400 bp
Cartridge Clean:	Fast Clean
Cartridge:	DNASep HT

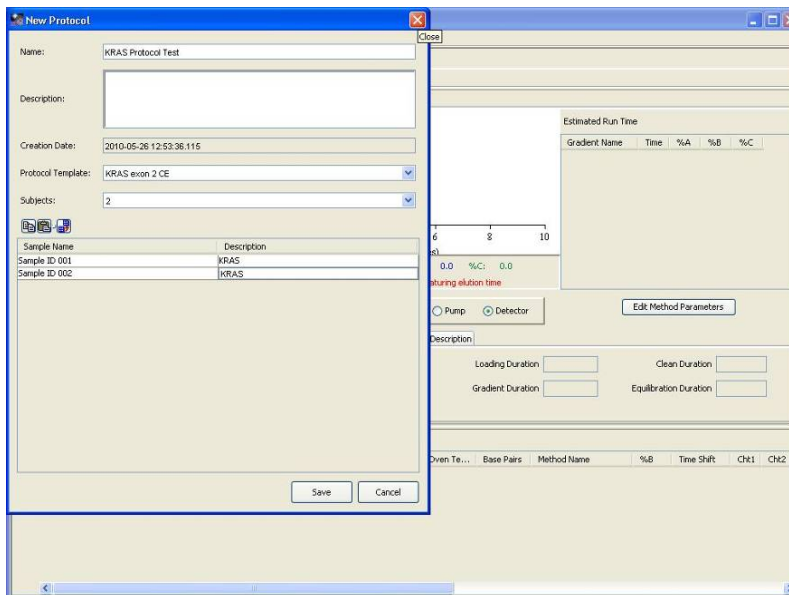


Obrázek 11 Obrazovka nastavení desky; 92 vzorků a kontroly

K-RAS exon 2 CE Protocol Template obsahuje tabulku nástřiků podle výše znázorněné ilustrace. Na jedné desce lze analyzovat 92 vzorků exonu 2 (oranžové jamky). Dále se na každou desku umísťují tři kontroly pro exon 2 (zelené jamky) a negativní kontrola.

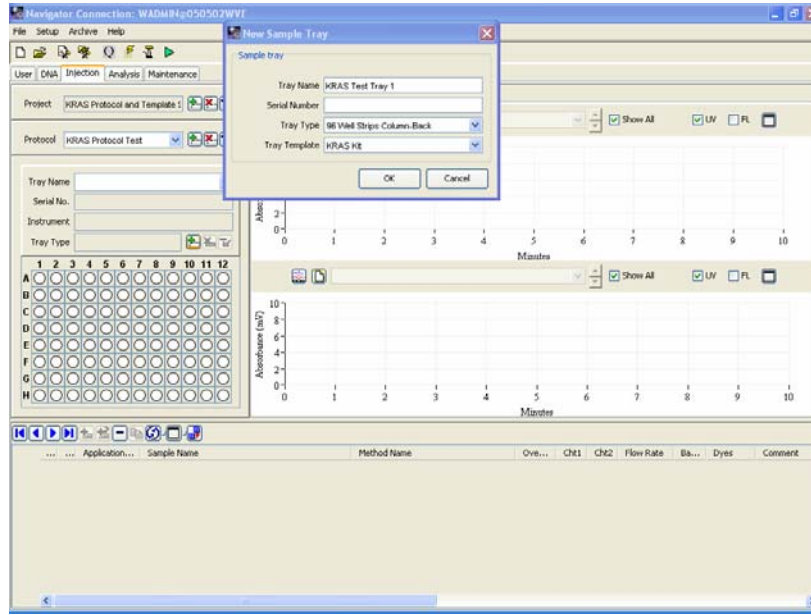
Všimněte si, že tabulka nástřiků je uspořádána ve sloupcovém formátu.

- K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 se umísťuje do jamky 1 (A1 v tabulce nástřiků).
 - K-RAS Positive Control Codon 12 se umísťuje do jamky 2 (B1 v tabulce nástřiků).
 - K-RAS Positive Control Codon 13 se umísťuje do jamky 3 (C1 v tabulce nástřiků).
 - negativní kontrola (bez přidané DNA) se umísťuje do jamky 4 (D1 v tabulce nástřiků).
1. Pro vytvoření nového protokolu otevřete [File] (Soubor) na rozbalovací liště s nabídkou, zvolte [Protocol] (Protokol) a poté [Template] (Templát).



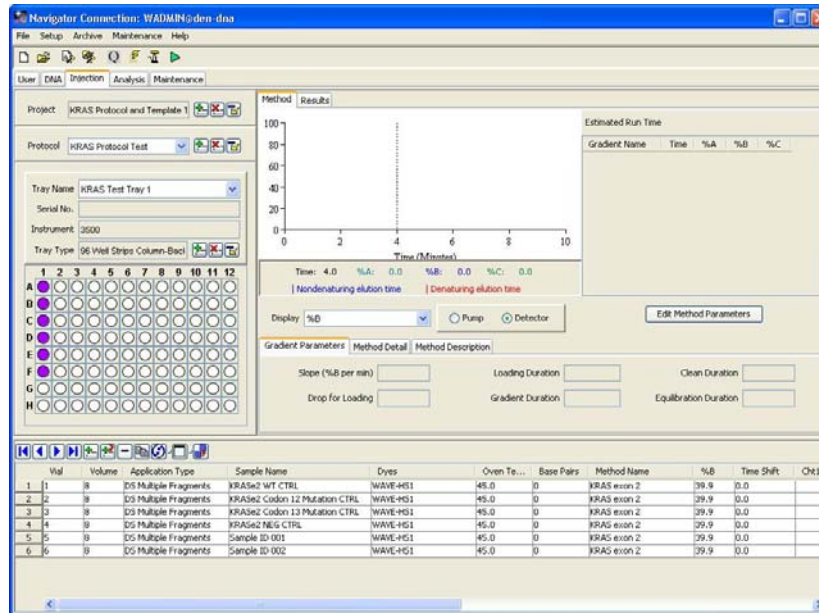
Obrázek 12 Nastavení nového protokolu

- a) Pojmenujte protokol.
 - b) Protocol Template (Templát pro protokol) musí být „KRAS Exon 2 CE“.
 - c) Zadejte počet Subjects/Samples, které mají být analyzovány.
 - d) Zadejte do Sample Names (Názvy vzorků) unikátní názvy pro každou položku Samples (Vzorky) a zvolte [Save] (Uložit).
2. Pro vytvoření tabulky nástřiků zvolte nový Tray Type (Typ nosiče).
 - a) Zadejte Tray Name (Název nosiče).
 - b) Vyberte Tray Type (Typ nosiče). Tray Type musí být ve sloupcovém formátu. Není-li k dispozici žádný nosič, naleznete v příručce Navigator Manual řešení potíží.
 - c) Zvolte K-RAS Kit Tray Template (Templát nosiče) a vyberte [OK]



Obrázek 13 Nastavení nového nosiče vzorků

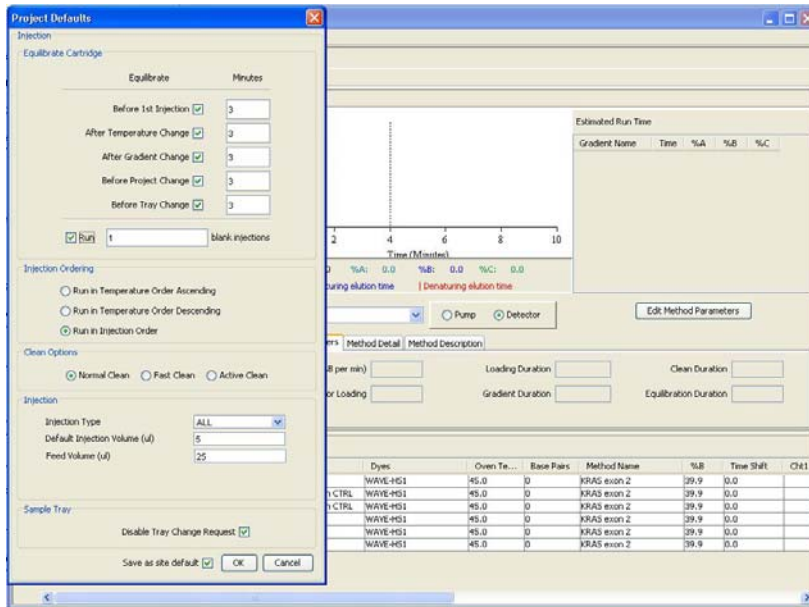
Poté se bude zaplňovat tabulka nosiče.



Obrázek 14 Ukázka zaplňovaného nosiče

- Na výše uvedené obrazovce je znázorněno zaplňování tabulky nástřiků s použitím K-RAS exon 2 CE template pro analýzu 2 vzorků.
- Vzorek 1 exon 2 K-RAS je třeba umístit na pozici E1 (jamka 5).

5. Aby se čerpadlo HSD nastavilo na provozní stav a aby se systém vyrovnal, musí být před analýzou vzorku proveden běh s prázdným vstříkem. To se provádí následujícím způsobem:
 - a) V položce nabídky [Setup] (Nastavení) v rozbalovací liště s nabídkou zvolte [Project Defaults] (Výchozí nastavení projektu).
 - b) Zaškrtnete políčko Run (Běh) v oddílu Equilibrate Cartridge (Ekvilibrovat patronu). Jeden prázdný nástřik je dostatečný.



Obrázek 15 Běh prázdného nástřiku

6. Lahvičku 96 (pozice H12) lze použít pro WAVE DNA Sizing Standard. Funkci Navigator Software Protocol nelze používat pro generování vstříků pro velikostní standard na gradientech používaných pro analýzu K-RAS. Pro vytvoření nástřiku velikostního standardu duplikujte dva řádky z tabulky nástřiků, kde je použita metoda K-RAS exon 2 CE. Změňte Sample Name (Název vzorku) na Sizing Standard (Velikostní standard).
7. Zvýrazněte dvě řádky pro vzorky s velikostním standardem a nechte proběhnout dva zvolené nástřiky. Znovu stiskněte tlačítko run (běh) a nechte proběhnout zbývající vzorky (všechny nástřiky na nosiči). Prázdný vstřík se nechá proběhnout před velikostními standardy.

Gradient pro exon 2 K-RAS

(maximální délka fragmentu = 400 bp)

Krok	Čas	%A	%B
Plnění	0.0	65.0	35.0
40 bp	0.5	60.1	39.9
66 bp	0.7	54.8	45.2
92 bp	1.0	51.1	48.9
118 bp	1.2	48.3	51.7
144 bp	1.5	46.2	53.8
170 bp	1.7	44.5	55.5
196 bp	2.0	43.1	56.9
222 bp	2.2	41.9	58.1
248 bp	2.5	40.9	59.1
274 bp	2.7	40.1	59.9
300 bp	3.0	39.4	60.6
326 bp	3.2	38.7	61.3
352 bp	3.5	38.2	61.8
378 bp	3.7	37.7	62.3
404 bp	4.0	37.3	62.7
Start Clean	4.1	65.0	35.0
Stop Clean	4.2	65.0	35.0
Start Equilibrate	4.3	65.0	35.0
Stop Equilibrate	4.4	65.0	35.0

Údržba DNASep HT Cartridges

Promývací postup

Při nastřikování produktů digesce SURVEYOR Nuclease do DNASep HT Cartridges ve WAVE System se doporučují dvě možnosti čištění: ACTIVE CLEAN (Aktivní čištění) nebo FAST CLEAN (Rychlé čištění). **Běžné čištění není dostatečné.**

Nepřehlédněte následující:

- Po každých 100 nástřicích produktů digesce SURVEYOR Nuclease je třeba provést HOT WASH (Horké promytí). Horké promytí se provádí při 80 °C čerpáním 100% Solution D (75% (obj/obj) ACN) po dobu 15 minut, po kterém následuje promývání systému směsí 1:1 WAVE Optimized Buffers A a B po dobu 30 minut. Horké promytí se provádí na konci každé dávky běhů z digesce SURVEYOR Nuclease, bez ohledu na to, zda bylo dosaženo 100 nástřiků či nebylo, např. když bylo používání patrony dočasně pozastaveno nebo se předpokládá změna v DHPLC analýze.
- Po každých 500 nástřicích produktů digesce SURVEYOR Nuclease musí být vyměněn vřazený filtr. Vřazený filtr musí být vyměněn také v případě, když dojde k příliš vysokému nárůstu tlaku (>1500 psi pro DNASep HT Cartridges).
- Po každých 500 nástřicích je třeba provést REVERSE HOT WASH (Zpětné horké promytí). Viz Provádění **REVERSE HOT WASH patrony DNASep HT Cartridge** v níže uvedené části.

VAROVÁNÍ Nedodržování těchto pokynů má za následek tvorbu vysokého tlaku v koloně a zhoršení funkčnosti kolony.

Provádění REVERSE HOT WASH patrony DNASep HT Cartridge

Provedení REVERSE HOT WASH:

1. Vyjměte DNASep HT Cartridge a znovu jí nasadte do průtočné cesty, ale v opačné orientaci.
2. Vyjměte vřazený filtr a nahraďte jej během REVERSE HOT WASH spojkou.
3. Nechte systémem čerpat 100% Solution D (75% (obj/obj) ACN) po dobu 30 minut při 80 °C a při průtokové rychlosti 0,9 mL/min.
4. Promývejte čerpáním směsí 1:1 WAVE Optimized Buffers A a B po dobu 1 hodiny při 80 °C a při průtokové rychlosti 0,9 mL/min.
5. Odstraňte spojku a nasadte nový vřazený filtr.

REVERSE HOT WASH je nutné provádět bez vřazeného filtru. Po REVERSE HOT WASH zasuňte nový vřazený filtr a nechte patronu běžet 500 nástřiků ve zpětném směru.

Kontaktní údaje

Vedení společnosti

Transgenomic, Inc.
12325 Emmet Street
Omaha
Nebraska 68164
United States of America

Telefon: (888) 233-9283*nebo +1 (402) 452-5400

Fax: +1 (402) 452-5401

E-mail: SURVEYORscan@transgenomic.com

Evropa

Autorizovaný zástupce pro ES

Transgenomic Limited
40 Watt Road, Hillington Park, Hillington
Glasgow G52 4RY, United Kingdom

Telefon: +44 141 892 8800

Fax: +44 141 883 5967

E-mail: SURVEYORscan@transgenomic.com

*Pouze v Severní Americe

Certifikace ISO 9001:2008

Transgenomic Inc používá systém řízení kvality, který odpovídá požadavkům ISO 9001:2008 pro výrobu přístrojů a biologicky spotřebitelných produktů pro genetické úpravy, detekci mutací a další unikátní testy na bázi biomarkerů certifikované podle BSI, č. certifikátu FM 538914.

www.transgenomic.com



TRANSGENOMIC®
the power of discovery

Obchodní známky a autorská práva

Tento produkt je vyroben pod exkluzivní licencí podle patentů USA 6,391,557; 5,869,245; a dalších patentů podaných k přihlášení. K používání SURVEYOR Nuclease je vyžadována licence od společnosti Transgenomic. Akademické, neziskové a ziskové organizace mají na základě koupě tohoto produktu omezená práva na používání SURVEYOR Nuclease pro výzkumné účely. Další prodej a jiné použití se přísně zakazují. Pro více podrobností se obraťte na společnost Transgenomic.

DNA polymeráza: Používání tohoto produktu je chráněno jedním nebo více následujícími americkými patenty a příslušnými patentovými nároky mimo USA: 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 a nároky mimo USA odpovídajícími americkému patentu č. 4,889,818. Koupě tohoto produktu zahrnuje omezenou, nepřenositelnou imunitu od soudního postihu podle uvedených patentových nároků při používání tohoto produktu pro vlastní výzkum nakupujícího. Neudílí se ani výslovně, odvozeně ani v důsledku zákonné překážky žádné právo podle jakéhokoli jiného patentového nároku (jako jsou patentované nároky na používání 5' nukleázy v amerických patentech č. 5,210,015 and 5,487,972), žádné právo provádět jakýkoli patentovaný postup ani žádné právo provádět jakékoli komerční služby jakéhokoli druhu, včetně a bez omezení předávání výsledků činnosti nakupujícího za poplatek nebo jiné komerční ohodnocení. Tento produkt je určen pouze pro výzkumné účely. Pro diagnostické použití podle patentů společnosti Roche se vyžaduje samostatná licence od společnosti Roche. Další údaje k nákupu licencí lze obdržet kontaktováním ředitele pro licence na adrese: Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

„TRANSGENOMIC“, „the power of discovery“, „WAVE“, „SURVEYOR“, „WAVE Optimized“, „DNASep“ a kulaté logo jsou registrované obchodní známky a „Navigator“ je obchodní známka společnosti Transgenomic, Inc. Všechny ostatní obchodní známky jsou obchodními známkami svých příslušných držitelů.

© 2010 Transgenomic, Inc. Všechna práva vyhrazena. Vytisknuto v USA.

Katalogové číslo dokumentu: 482276-CZ-04