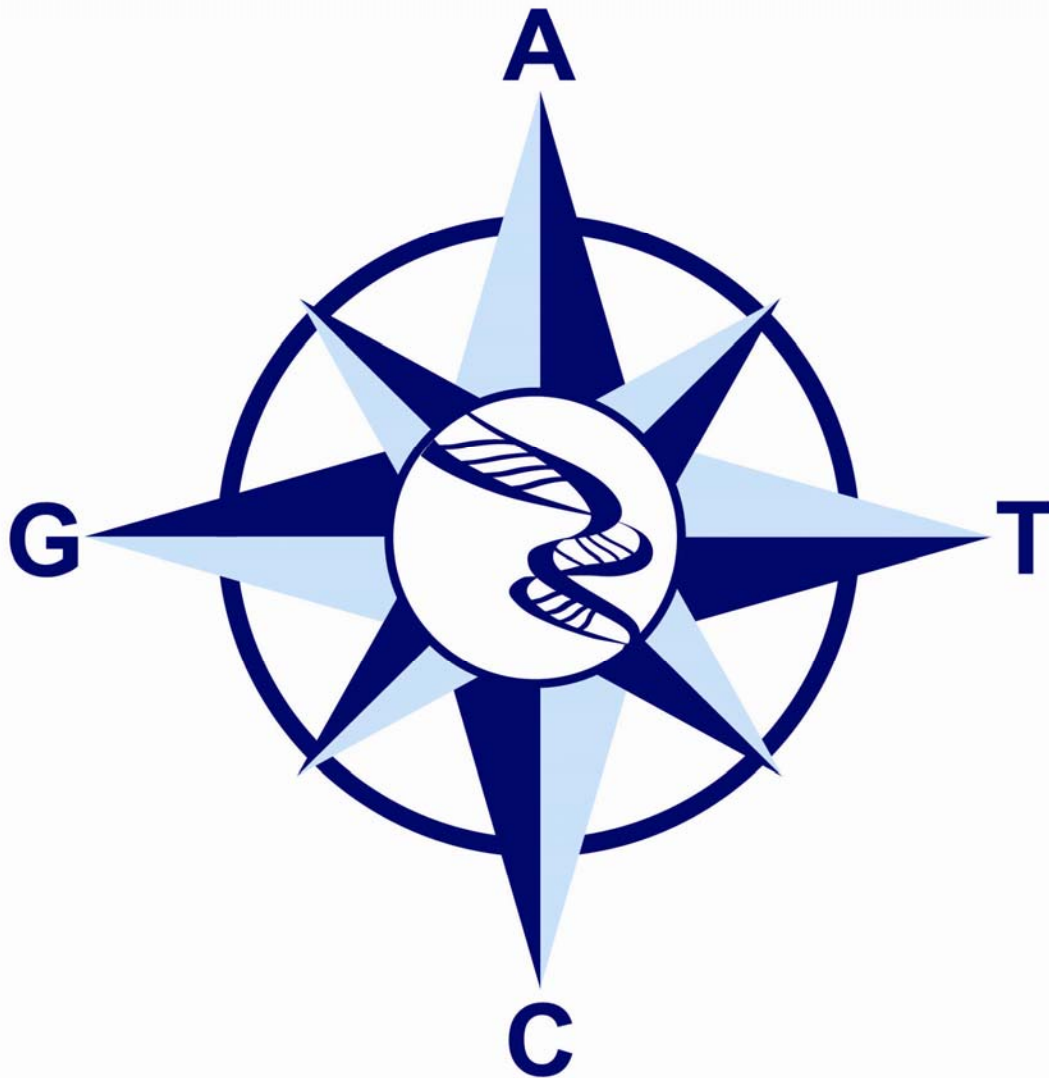




TRANSGENOMIC®

the Power of Discovery®

Brugsanvisning for SURVEYOR® Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD*



www.transgenomic.com

Indhold

Producent.....	2
SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	2
Tilsigtet brug	2
Brugsindikationer	2
Principper for SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection analyse	2
K-RAS.....	2
SURVEYOR Nuclease	3
Sporbarhed af kitkontroller	4
Komponenter	4
Antal prøver, der kan testes med et Kit.....	5
DNA-sekventering.....	5
Yderligere påkrævet udstyr og reagenser	5
Præparation af reagenser	5
Opbevaring og holdbarhed efter kittet bruges for første gang	6
Advarsler og forholdsregler	6
Primær prøvetagning, håndtering og opbevaring	6
Analyseprocedure	6
Somatisk mutationsdetektion med SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i> - en oversigt.....	6
Trin-for-trin vejledning	7
K-RAS protokolinstallation på WAVE HS System	7
WAVE System INDLEDENDE opsætning/søjlekalibrering (Navigator Software) for SURVEYOR Nuclease applikationer.....	7
WAVE System INDLEDENDE opsætning/ovnkalibrering.....	7
WAVE HT HS overvejelser inden K-RAS prøveanalyse.....	7
Templateovervejelser.....	7
Primerovervejelser	8
Amplifikationsprotokol	8
Thermocyclerprogram for Amplifikationsprotokol	9
Kvalitetskontrol af PCR-produkter	10
SURVEYOR Nuclease fordøjelse	10
Arbejdsflowovervejelser	11
Kontrolprocedurer	11
Kvalitetskontrol af SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	11
Sådan anvendes K-RAS Kontrol Plasmid DNA'er	11
Fortolkning af resultater	12
Analyse af K-RAS Exon 2 med SURVEYOR Nuclease.....	12
Eksempler på resultater	13
Ydelseskarakteristika	14
Detektionsniveau for SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	14
K-RAS Exon 2 G12S mutationsniveau af detektion-fortyndingsserier	15
K-RAS Exon 2 G13D mutationsniveau af detektion-fortyndingsserier.....	16
Fortolkning af lav procentdel-mutationsprøver	16
Analyseprocedurebegrænsninger	18
Literaturhenvisninger.....	18
Appendiks A.....	20
Problemløsningsguide	20
Appendiks B.....	23
WAVE System INDLEDENDE opsætning/søjlekalibrering (Navigator Software) for SURVEYOR Nuclease applikationer.....	23
WAVE HS System parametre for K-RAS Protokol	25
Gradient for K-RAS Exon 2.....	29
Vedligeholdelse af DNASep HT Cartridges	30
Vaskeprocedure.....	30
Sådan udføres en REVERSE HOT WASH på en DNASep HT Cartridge	30
Kontaktoplysninger.....	31
Varemærker & copyright	31

Producent

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* er produceret af Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA. Tlf. 1-402-452-5400.

Den autoriserede repræsentant i EU er Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, UK. Tlf. +44-141-892-8800.

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

Dette kit leveres som en enkelt æske, der indeholder de komponenter, der er anført nedenfor. Denne brugsanvisning er tilgængelig som en download.

Tilsligtet brug

Kun til professionel brug. Transgenomic's SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* er en *in vitro* diagnostisk analyse, der påviser mutationer i exon 2 af K-RAS genet. Mutationer i codon 12 og 13 indikeres med karakteristiske analyseresultater. Dette kit er designet til at blive brugt i et klinisk diagnostisk laboratorium af passende uddannet personale, der tester DNA, der er ekstraheret fra formalinfixeret, paraffinindlejret væv.

Brugsindikationer

Klinikere kan bruge SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* som hjælp til at bestemme, om patienters colorectale carciner måske eller måske ikke vil respondere på anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) behandling, som fx Vectibix[®] eller Erbitux[®].

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* **må ikke** anvendes til diagnose af colorectal eller nogen anden cancer.

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* indikerer tilstedeværelse af mutationer i K-RAS genet exon 2, men bekræfter ikke mutationens sekvensidentitet. For at bekræfte den præcise, detekterede mutation vil yderligere analyse, som fx DNA-sekventering, være påkrævet.

De resultater, der opnås med dette kit, skal benyttes af en kliniker, som en indikation for en patients mutationsstatus. Andre kliniske faktorer skal tages i betragtning og SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* resultater **må ikke bruges som den eneste anvendte metode for at træffe afgørelse om eventuel behandling for patienter med colorectal cancer**. Mere specifikt skal prøver, der tester positive for en K-RAS mutation med dette kit, bekræftes med DNA-sekventering.

Principper for SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection analyse

K-RAS

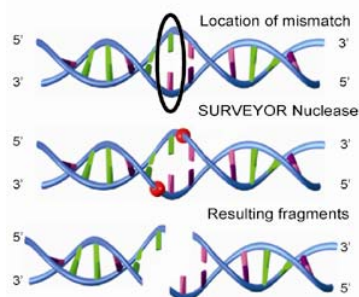
Nyudviklede terapeutiske medikamenter, der er målrettet mod epidermal growth factor receptor (EGFR), som fx cetuximab (Erbitux) og panitumumab (Vectibix), har vist sig at være effektive mod colorectal cancer. For visse colorectale cancerer er disse lægemidler dog ineffektive. Ca. 40% af colorectale tumorer bærer K-RAS gen mutationer og disse mutationer er blevet associeret med ringe respons på EGFR antagonist. K-RAS mutationsstatus kan derfor bruges til at bestemme, hvorvidt en tumor vil respondere på anti-EGFR behandling.

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* er et diagnostisk kit til detektering af alle sekvens og små insertion/deletion mutationer i exon 2 af K-RAS genet. Positive kontroller er inkluderet for exon 2 mutationer i codon 12 og 13, der er blevet associeret manglende respons på behandling EGFR antagonist.

Dette kit anvender Transgenomic's SURVEYOR Nuclease og WAVE HS System teknologier til at give enkelt og sensitiv mutationsdetektion, der er i stand til at detektere en blanding af 1% mutant i en baggrund af 99% non-mutant DNA. Valideringsstudier har vist ekstremt høj overensstemmelse med sekventering i velkarakteriserede colorectal cancer-prøver. SURVEYOR Nuclease fordøjelsesmønstre for codon 12 og 13 er stærkt specifikke. Brug af SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* vil både reducere brugerens sekventeringsbyrde og bistå til sekvensidentifikation, hvis automatiseret sekventeringssoftware ikke finder en mutation.

SURVEYOR Nuclease

Transgenomic's SURVEYOR Nuclease er en mismatch-specifik DNA endonuclease, der kan scane for kendte og ukendte mutationer og polymorfier i heteroduplex DNA. Enzymet kløver DNA med høj specificitet på steder med base-substitution mismatch og andre forandringer. DNA endonucleasen klipper begge strenge på DNA heteroduplexen på 3'-siden af mismatch positionen¹. Insertion/deletion-mismatches og alle base-substitution mismatches genkendes. Effektiviteten af kløvningen varierer med mismatch sekvensen^{1,2}.



Figur 1. Virkningsmekanisme for SURVEYOR Nuclease.

Endonucleasen genkender en mismatch og kløver på 3'-siden af hver base i mismatchen, hvilket efterlader et enkelt 3'-base-overhæng.

SURVEYOR Nuclease har været brugt i en lang række sammenhænge for nøjagtigt at kunne detektere forskellige mutationer og polymorfier i gener⁵. SURVEYOR Nuclease er især blevet brugt til at verificere tilstedeværelse af kendte mutationer i en række gener, der er associeret med nyrrecancer³, lungecancer^{4, 9, 10, 12-15}, hoved- og halscancer⁶, leukæmi^{7, 16, 17}, endometrial cancer⁸ og til forudsigelse af respons på strålebehandling¹¹.

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* for WAVE HS Systems er designet til at kløve mismatches i K-RAS exon 2 for efterfølgende analyse ved ion-pair reverse fase HPLC ved brug af WAVE HS Systems.

Bemærk: Kun den DNA-polymerase, der leveres med dette kit, må bruges til denne analyse.

Bemærk: De vaskeprocedurer, der specifikt anbefales og beskrives i denne "Brugsanvisning til brug for SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* for WAVE HS Systems" og brugen af DNASep[®] HT Cartridges er forskellige fra de vaskeprocedurer, der bruges for standard WAVE DHPLC procedurer. Følg de specifikke anbefalinger i denne manual for at opretholde optimal ydelse fra WAVE HS System.

For korrekt anvendelse af dette kit anbefaler vi, at denne manual læses grundigt igennem og at vejledninger og retningslinier heri følges nøje. Førstegangsbrugere skal udføre de kontroleksperimenter, der er beskrevet i afsnittet "Sådan anvendes K-RAS Kontrol Plasmid DNA", side 11.

Hvis du skulle have yderligere spørgsmål eller har brug for hjælp, bedes du ringe **+44 (0) 141 892 8800** (Europa) og bede om "K-RAS support". Du kan også sende os en e-mail på:

SURVEYORscan@transgenomic.com

Sporbarhed af kitkontroller

De kontroller, der leveres med dette kit, er plasmid-kloner af K-RAS exon 2 sekvenser. Alle kloner er blevet sekventeret for at kontrollere sekvensens nøjagtighed ved sammenligning med NCBI Referencesekvens: NG_007524.1.

K-RAS control: Wild-Type Exon 2 blev konstrueret ved PCR af K-RAS exon 2 fra en wild-type genomisk DNA-præparation og kloning.

K-RAS Positive Control Codon 12 blev konstrueret ved site-directed mutagenese af K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 klon. DNA-sekventering bekræftede, at den eneste ændring i sekvensen er i codon 12 med en GGT>AGT ændring.

K-RAS Positive Control Codon 13 blev konstrueret ved site-directed mutagenese af K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 klon. DNA-sekventering bekræftede, at den eneste ændring i sekvensen er i codon 13 med en GGC>GAC ændring.

Se "Sådan anvendes K-RAS Kontrol Plasmid DNA" på side 11 for yderligere information om DNA kontrolsekvenser.

Komponenter

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* reagenser leveres i en æske med 16 rør. Der er 4 tomme huller i hver æske.

Katalognummer	Komponent	100-Reaktion kit (710101-CEIVD) Volumen leveret
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 rør)	2 x 250 μL
710151R	K-RAS Primer: Exon 2 Reverse (10 μM) (2 rør)	2 x 250 μL
710160	SURVEYOR Nuclease W (2 rør)	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 Kontrol: 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	Brugervejledning	Download fra websitet* http://www.transgenomic.com/pd/surveyor/SurveyorKRAS_CEIVD_ug.asp

Antal prøver, der kan testes med et Kit

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* indeholder reagenser til 100 reaktioner. Det totale antal prøver, der kan testes afhænger af den gennemsnitlige batchstørrelse af prøver, der testes på et enkelt tidspunkt, da ét sæt kontroller skal testes sammen med prøver i hver enkel prøvebatch.

Tabellen nedenfor viser antallet af prøver, der kan analyseres med K-RAS kittet, alt afhængig af den gennemsnitlige batchstørrelse. Dette beregnes på basis af, at 4 kontroller er påkrævet for hver prøvekursel og en grænse på 100 reaktioner pr. kit.

Hvis batchstørrelsen forøges, vil antallet af prøver, der kan testet i et kit ligeledes blive forøget, hvilket vil reducere den gennemsnitlige reagenspris pr. prøve.

Batch-størrelse	Antal kontroller + Prøver	Tests pr. prøvekursel	Antal prøvekursler pr. kit	Prøver testet pr. kit
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

DNA-sekventering

Hvis det er påkrævet, er der medleveret tilstrækkelige primere til PCR-amplifikation af K-RAS exon 2 til, at de også kan bruges ved DNA-sekventering af alle de testede prøver.

Yderligere påkrævet udstyr og reagenser

Yderligere komponenter og udstyr, der er påkrævet til brug af SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* inkluderer følgende:

WAVE System (enten 3500HT eller 4500HT modeller), WAVE HSD Accessory, DNASep HT Cartridge (Transgenomic PN DNA-99-3710), WAVE Optimized[®] Buffers (Buffer A, Buffer B og Solution D er henholdsvis Transgenomic PN 553401, 553402 og 553412; Syringe Wash Solution [for model 3500 system] og HS Staining Solution I er henholdsvis PN 553411 og 553442), 0,2 ml-PCR-rør, 2,0 ml-mikrocentrifugerør, mikropipetter, pipettespidser, WAVE DNA Sizing Standard (Transgenomic PN 560078), 100-bp DNA mass ladder, vand af molekylærbiologisk kvalitet, isbad, vortexer, mikrocentrifuge, termocykler, agarosegeler og elektroforeseudstyr til agarosegel.

Præparation af reagenser

Alle reagenser, der leveres med dette kit, er klar til brug. Nogle komponenter skal optøes, vortexes eller centrifugeres i en mikrocentrifuge før brug; tjek detaljer i "Analyseprocedure" nedenfor.

Reagenser skal kombineres for at producere Mastermix og reaktionsblandinger; detaljer er anført under "Analyseprocedure" nedenfor – se side 6.

Opbevaring og holdbarhed efter kittet bruges for første gang

Kittet skal opbevares mellem $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en fryser med konstant temperatur, indtil det skal bruges. Bemærk udløbsdatoen for hvert enkelt kit, der modtages. Kittet må ikke anvendes efter udløbsdatoen er overskredet.

SURVEYOR Nuclease-blandingen, der forberedes i trin 7 af SURVEYOR Nuclease Digestion (fordøjelse) (side 10), skal anvendes omgående, da SURVEYOR Nuclease W inaktiveres over tid ved tilstedeværelse af de andre komponenter i SURVEYOR Nuclease reaktionsblandingen.

Advarsler og forholdsregler

Ingen af reagenserne i dette kit udgør en sundhedsfare i de mængder, der leveres. Transgenomic MSD-710101-CEIVD kan downloades fra

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

Ingen substanser i dette kit er af animalsk eller human oprindelse, som kan udgøre en infektionsrisiko.

Dette kit bør kun anvendes af personer, der er blevet uddannet i de behørigte laboratorietechnikker. Ved arbejde med komponenterne i dette kit skal der altid bruges en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller. Efter brug skal kitkomponenterne bortskaffes som klinisk affald og i overensstemmelse med lokale regler og forordninger.

Mindre volumener af reagenser, der pipetteres fra rørene i dette kit, er kun beregnet til engangsbrug. Dette kits komponenter er blevet valideret som stabil efter 25 nedfrysningsoptøningscyklusser. Dette kit må ikke anvendes, hvis dette antal af nedfrysningsoptøningscyklusser overstiges.

Primær prøvetagning, håndtering og opbevaring

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* kræver DNA ekstraheret fra formalin-fikseret, paraffinindlejrede colorectale cancer-tumor-prøver. For at opfylde de vigtigste kvalitetskontrollværdier for korrekt brug af dette kit, skal den ekstraherede DNA opfylde de følgende standarder:

- Q-PCR af det ekstraherede DNA skal indikere, at der er amplificerbart template DNA.
- 260/280 absorptionsforholdet skal være $>1,80$.
- Template-DNA-koncentration for hver enkelt prøve skal være $25\text{ ng}/\mu\text{L}$.

Ekstraheret DNA, der ikke er tiltænkt til øjeblikkelig analyse med dette kit, skal opbevares ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analyseprocedure

Somatisk mutationsdetektion med SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* - en oversigt

Mutationsdetektion og bekræftelse med SURVEYOR Nuclease involverer fire trin:

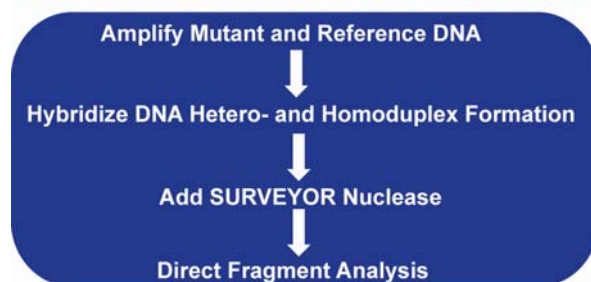
Trin 1 - PCR-amplifikation af mutant (test) og normal (reference) DNA.

Trin 2 - Der fortsættes fra den endelige PCR-amplifikationscyklus, reaktionen opvarmes for at smelte alle dobbeltstrengene og afkøles langsomt for optimal dannelse af hetero- og homoduplekser.

Trin 3 - Behandl den annealede heterodupleks-/homodupleksblanding med SURVEYOR Nuclease. Reference-DNA alene, der behandles på samme måde, anvendes som en baggrundskontrol.

Trin 4 - Analysér DNA-fragmenterne med WAVE HS System. Dannelsen af nye kløvningsprodukter, der skyldes tilstedeværelsen af en eller flere mismatches, indikeres ved tilstedeværelse af yderligere peaks. Kløvningsprodukternes retentionstider indikerer fragmenternes størrelse og dermed mismatchens eller mismatchernes placering.

Mutation Detection in Four Easy Steps



Trin-for-trin vejledning

K-RAS protokolinstallation på WAVE HS System

K-RAS exon 2 CE-protokollen for WAVE HS System kan downloades i Navigator™ Software for hurtig og nem opsætning. Gå til:

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

og følg vejledningen for installation af K-RAS protokollen og verifikationsprocedurer.

WAVE System INDLEDENDE opsætning/søjlekalibrering (Navigator Software) for SURVEYOR Nuclease applikationer

Der henvises til **Appendiks B - WAVE System INDLEDENDE opsætning/søjlekalibrering (Navigator Software) for SURVEYOR Nuclease applikationer** i denne brugervejledning.

WAVE System INDLEDENDE opsætning/ovnkalkibrering

Se WAVE Operator's User Manual for ovnkalkibreringsprocedurer. **Vi anbefaler, at kalibreringer udføres en gang om måneden.**

WAVE HT HS overvejelser inden K-RAS prøveanalyse

1. Inden prøver køres skal WAVE DNA Sizing Standard køres på K-RAS gradient (**Appendiks B – Gradient for K-RAS Exon 2**) for at sikre korrekt funktionalitet af systemet.

Templateovervejelser

1. For template-DNA ekstraheret fra formalin-fikseret, paraffinindlejret væv skal der bruges normale laboratorieprocedurer til at vurdere den ekstraherede DNA's kvalitet og kvantitet for at sikre, at der er amplificerbart template for PCR.
2. 260/280 absorbansforholdet skal være >1,80.
3. For at fremskynde PCR-opsætning skal den anvendte template-koncentration for hver enkelt prøve være 25 ng/μL. Fortynd template-DNA med vand af molekylærbiologisk kvalitet, hvis det påkræves.

Primerovervejelser

1. Sekvenserne af de primere, der medleveres i dette kit, er som følger:

Amplikon		Sekvens
Exon 2	Forward	cggGTTTGTATTAAGGTTACTGGTGGAGT
	Reverse	cgggTTTATCTGTATCAAAGAATGGTCCT

BEMÆRK: Primerne indeholder små GC clamps. 5'-delen af exon 2 er meget AT rig.

2. Amplikonsekvenserne er som følger:
 - a. Forward primere er fremhævet med **Grøn**. Reverse primere er fremhævet med **Rød**. Koderegioner er fremhævet med **Grå**. De mest almindelige mutationsregioner er fremhævet med **Lilla**. Store bogstaver, der ikke er fremhævet er ikke-kodende cDNA-regioner.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2

MD Loci: 10428 - 10706

Str.: 286 bp

cgggTTTGTATTAAGGTTACTGGTGGAGTatttgatagtgattaaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacattttcattatttt
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGCCGTA**
GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATC
CAACAATAGAGgtaaatctgttttaatatgcatattactggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

Amplifikationsprotokol

1. Transgenomic premixed dNTP solution (PN 703065) leveres som arbejdskoncentration på 10 mM total deoxynukleotid (2,5 mM af hver af de fire deoxynukleotider).
2. Forward og reverse primere (henholdsvis PN 710151F og 710151R) for hver enkelt amplikon leveres som 10 µM.
3. Tag 10 µM primere, 10 mM premixed dNTP opløsning og DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) ud af fryser og optø dem på is.
4. Forbered Masterblanding på is.
5. Brug den følgende tabel som en vejledning til tilberedning af Masterblanding for K-RAS exon 2:

	1.00
Volumenberegning:	
Vandvolumen (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
Total volumen af Masterblanding:	48.0
Volumen af ekstraheret DNA, der skal tilsættes (µL med 25 ng/µL)	2.0**
Total volumen af PCR-reaktion:	50.0

**Bemærk: for ekstraherede DNA-koncentrationer på <25 ng/µL skal volumen af ekstraheret DNA forøges proportionelt og volumen af vand i Masterblandingen skal ligeledes reduceres med den samme mængde for at resultere i 50 µL pr. reaktion. Alle prøver, der forberedes med denne masterblanding, skal have den ekstraherede DNA fortyndet til ca. det samme

laveste koncentrationsniveau. Brug af template DNA-koncentrationer på <5 ng/µL anbefales ikke.

6. Beregn de påkrævede volumener for Masterblanding ved at gange de volumener, der er anført i ovenstående diagram, med det totale antal prøver, der skal analyseres plus 4 yderligere reaktioner for kontrollerne.
7. Afmærk 0,2 mL PCR-rør eller brønde i en 96-brønds plade med behørig prøveinformation.
8. Afmærk et 2,0 mL-centrifugerør til Masterblanding-præparation.
9. Tilsæt det påkrævede volumen af vand af molekylærbiologisk kvalitet til det 2,0 mL-centrifugerør afmærket Masterblanding.
10. Vortex DNA Polymerase 10X PCR Buffer i ~10 sek.
11. Tilsæt påkrævet mængde DNA Polymerase 10X PCR Buffer til det 2,0 mL-centrifugerør.
12. Vortex 10,0 mM premixed dNTP arbejdsopløsning i ~10 sek.
13. Tilsæt påkrævet volumen af 10,0 mM premixed dNTPs arbejdsopløsning til det 2,0 mL-centrifugerør.
14. Tilsæt påkrævet volumen af K-RAS Primer: Exon 2 Forward til det 2,0 mL-centrifugerør.
15. Tilsæt påkrævet volumen af K-RAS Primer: Exon 2 Reverse til det 2,0 mL-centrifugerør.
16. Tag DNA Polymerase (PN 703310) ud af fryseren.
17. Centrifuger DNA Polymerase i ~10 sek.
18. Vortex DNA Polymerase i ~10 sek.
19. Tilsæt påkrævet volumen af DNA Polymerase til det 2,0 mL-centrifugerør.
20. Sæt låg på det 2,0 mL-centrifugerør, der indeholder Masterblandingen.
21. Vortex det 2,0 mL-centrifugerør i ~30 sek. før brug.
22. Opbevar på is indtil brug.
23. Afpipetter 48,0 µL Masterblanding i de behørlige brønde, idet der skiftes pipettespids ind imellem, hvis der anvendes en enkeltkanalpipette. Hvis der bruges en repeatpipette, skal det sikres, at der ikke er spild/stænk fra brønd til brønd. Pladen skal opbevares på is.
24. De behørlige brønde tilsættes 2,0 µL af hver enkelt prøve-template-DNA, hver enkelt kontrol-template-DNA (PN 710140, 710143, 710144) eller no-template-control (vand).
25. Når pipettering er udført, skal hver enkelt brønd lukkes med 8-hætte strips (hvis der bruges en 96-brønds plade) eller sæt låg på 0,2 mL PCR-rørene. Tjek at lågene er forseglet korrekt.
26. Vortex (~1/2 hastighed) i 30 sek.
27. Inspicér pladerne eller 0,2 mL PCR-rørene. Kontrollér at opløsningen er i bunden af brønden. Hvis ikke, skal den centrifugeres. Efter centrifugering skal vortexerens hastighed reduceres og der blandes i ~15 sek.

Thermocyclerprogram for Amplifikationsprotokol

1. Brug den følgende thermocyclerprotokol for PCR Amplifikation og heteroduplex formation:

Initial denaturering	95 °C	5 min
15 cyklusser touchdown	95 °C	30 sek
	62 °C, -0,5 °C/cykel	30 sek
	72 °C	25 sek
30 cyklusser amplifikation	95 °C	30 sek
	55 °C	30 sek
	72 °C	25 sek
Final extension	72 °C	2 min
Heteroduplex formation	95 °C	2 min
	4 °C	Hold

Kvalitetskontrol af PCR-produkter

1. Amplikon kvalitet og kvantitet skal kontrolleres med gelelektroforese eller WAVE DHPLC, før der fortsættes med SURVEYOR Nuclease fordøjelse.
2. Analyser en alikvot af PCR-produktet sammen med flere forskellige mængder af en 100-bp DNA mass ladder.
3. Brug ladderen til at estimere koncentrationen af den amplificerede DNA.
4. Kun et enkelt bånd >20 ng/μL, der korresponderer med hovedproduktet, skulle observeres.
5. Hvis der er flere bånd tilstede, skal det sikres, at kvaliteten af template-DNA var tilstrækkelig (se **Appendiks A – Problemløsningsguide**).
6. Hvis der ikke observeres noget produkt, skal det sikres, at kvaliteten af template-DNA var tilstrækkelig (se **Appendiks A – Problemløsningsguide**). Hvis kvaliteten opfylder specifikationerne, skal template-volumen forøges til 4,0 μL pr. 50 μL reaktion (reducér vand pr. reaktion til 31,0 μL).
7. PCR på no-template-control skal ikke give noget produkt. Hvis DNA-produkter er synlige med denne kontrol, skyldes det sandsynligvis kontaminering; se Problemløsningsguide side 20.

SURVEYOR Nuclease fordøjelse

1. Når prøve-PCR'en anses for at være af tilstrækkelig kvalitet og kvantitet, skal SURVEYOR Nuclease fordøjelsesreaktionen udføres, som beskrevet nedenfor.
2. Optø 0,15 M MgCl₂ opløsningen og SURVEYOR Enhancer Cofactor på is.
3. Tilsæt 10,0 μL af hver prøve til et nyt 0,2 mL PCR-rør eller brønd i en 96-brønnds plade.
4. Hvis der udføres flere prøver, skal der forberedes en ny blanding af 0,15 M MgCl₂ Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 og SURVEYOR Nuclease W (SURVEYOR Nuclease-blanding).
 - a. Centrifuger hver enkelt reagens før brug.
 - b. Vortex hver enkelt forsigtigt før afpipettering.
 - c. For hver enkelt fordøjelse skal de følgende komponenter tilsættes til et 0,2 mL PCR- (eller større) mikrocentrifugerør.
 - 1,0 μL 0,15 M MgCl₂ Solution (PN 708027)
 - 1,0 μL SURVEYOR Enhancer Cofactor (PN 708049)
 - 1,0 μL SURVEYOR Enhancer W2 (PN 710161)
 - 2,0 μL SURVEYOR Nuclease W (PN 710160)
5. Centrifuger SURVEYOR Nuclease-blandingen i 10 sek. ved lav hastighed.
6. Vortex forsigtigt SURVEYOR Nuclease-blandingen i 10 sek. ved lav hastighed.
7. Placér SURVEYOR Nuclease-blandingen på is indtil brug.
8. Afpipetter 5,0 μL af SURVEYOR Nuclease-blandingen til hver enkelt 10,0 μL hybridiseret PCR-produkt.
9. Når afpipettering er fuldført skal fordøjelses- 0,2 mL PCR-rørene eller 96-brønnds pladen centrifugeres i 10 sek.
10. Vortex forsigtigt prøve- 0,2 mL PCR-rørene eller 96-brønnds pladen i 10 sek.
11. Inkubér ved 42 °C i **30** min.
12. Tilsæt 1,0 μL Stop Solution (PN 708030) til hvert enkelt rør eller brønd og vortex forsigtigt (total SURVEYOR Nuclease reaktionsvolumen er 16,0 μL).
13. Injicér 8,0 μL af hver fordøjelse med de specificerede gradienter. Se **Analyse af K-RAS Exon 2 med SURVEYOR Nuclease** side 12.

Bemærk: SURVEYOR Nuclease-blandingen, der forberedes i Trin 7, skal anvendes omgående, da SURVEYOR Nuclease W inaktiveres over tid ved tilstedeværelse af de andre SURVEYOR Nuclease reaktionsblandingskomponenter.

Arbejdsflowovervejelser

Kittet er designet til at tillade mutationsanalyse af 100 prøver; Figur 11 viser et 96-brønnds pladelayout med kontroller og 92 prøver. Mindre prøvebatches kan køres, men kontrollerne og WAVE DNA Sizing Standard skal køres hver eneste gang. Der er tilstrækkelige kontrolmaterialer i kittet til, at alle kombinationer af prøvebatchstørrelser kan bruges.

Generelt set skal bearbejdning af prøver udføres fra start til slut, som beskrevet i denne Brugervejledning. Hvis bearbejdning af en prøve stoppes, før alle trin er fuldført, skal DNA'et opbevares ved -20 °C, indtil det næste trin udføres. Det skal imidlertid undgås, at frosne prøver bliver udsat for gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser og opbevaring af PCR-amplificeret DNA eller SURVEYOR Nuclease fordøjelse-produkter ved -20 °C i længere perioder (>1 uge) skal undgås.

Kontrolprocedurer

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

Kontrol Plasmid DNA er inkluderet i kittet for kvalitetskontrolltjek ved specifikke trin i analyseproceduren. For Amplifikationprotokollen (side 8) er disse kontroller en metode til at sikre, at Masterblandingen er forberedt rigtigt og at amplifikationen fungerer korrekt. no-template-control (hvor vand tilsættes i stedet for template-DNA) anbefales ligeledes for at tjekke for mulig kontamination af kitkomponenter med en DNA-template.

På SURVEYOR Nuclease fordøjelse-trinnet giver amplikonerne fra disse 3 Kontrol Plasmid DNA'er et effektivt tjek på, hvorvidt kløvningsreaktionsbetingelserne (SURVEYOR Nuclease blandingspræparation og inkubationsbetingelser) var tilfredsstillende. På analysetrinnet giver WAVE System kurver af disse SURVEYOR Nuclease fordøjede kontrolamplikoner vejledning om, hvor codon 12 og 13 mutationer, selv ved lave niveauer, vil eluere (se Figur 3 og 4).

Hvis enten PCR-amplikonerne eller SURVEYOR Nuclease kløvningsfragmenterne, der er afledt fra Kontrol Plasmid DNA'erne, ikke matcher de resultater, der er anført i PCR-produkternes Kvalitetskontrol (side 10) eller Resultatseksempler (side 13), skal Problemløsningsguiden i Appendiks A konsulteres, eller Transgenomic Technical Support kontaktes, før der fortsættes med yderligere trin i analysen af patientprøver.

Sådan anvendes K-RAS Kontrol Plasmid DNA'er

Kittet leveres med tre kontrol DNA'er:

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2; PN 710141

K-RAS Positive Control Codon 12; PN 710143

K-RAS Positive Control Codon 13; PN 710144

Disse kontrol DNA'er er plasmider med inserts. De Positive Kontroller indeholder to plasmider hver: en 50:50 blanding af Wild-type Kontrol og en mutationsklon, der er forskellig fra Wild-typen på et enkelt basepar. Kontrollerne leveres i separate hætteglas, hver i en koncentration på 2,5 ng/µL.

Forward og reverse primerse, der er nødvendige for PCR-amplifikation, leveres separat i kittet. Sekvensen af Wild-typen og Positive Kontroller er vist nedenfor.

Forward primere er fremhævet med **Grøn**. Reverse primere er fremhævet med **Rød**. Koderegioner er fremhævet med **Grå**. Sekvensforskelle i de Positive Kontroller er fremhævet med **Lilla**. Store bogstaver, der ikke er fremhævet er ikke-kodende cDNA-regioner.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2

MD Loci: 10428 - 10706

Str.: 286 bp

cgggtttgtattaaaagggtactggaggattttgatagtgattaaacctatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTA
GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATC
CAACAATAGAGgtaaactctgtttaaatatgcatattactggtgcaggaccattcttfgatacagataaa^{cccg}

K-RAS Positive Control Codon 12

MD Loci: 10428 - 10706

Str.: 286 bp

cgggtttgtattaaaagggtactggaggattttgatagtgattaaacctatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT[G/A]GTGGCG
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT
CCAACAATAGAGgtaaactctgtttaaatatgcatattactggtgcaggaccattcttfgatacagataaa^{cccg}

K-RAS Positive Control Codon 13

MD Loci: 10428 - 10706

Str.: 286 bp

cgggtttgtattaaaagggtactggaggattttgatagtgattaaacctatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGT[G/A]CG
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT
CCAACAATAGAGgtaaactctgtttaaatatgcatattactggtgcaggaccattcttfgatacagataaa^{cccg}

Følg vejledningen i Amplifikationsprotokollen (side 8), SURVEYOR Nuclease fordøjelse (side 10) og Analyse af K-RAS Exon 2 med SURVEYOR Nuclease (side 12) for brug af disse kontroller.

VI ANBEFALER STÆRKT, AT FØRSTEGANGSBRUGERE UDFØRER EKSPERIMENTER MED KONTROLLERNE ALENE, FØR DE TESTER GENOMISKE PRØVER

Fortolkning af resultater

Analyse af K-RAS Exon 2 med SURVEYOR Nuclease

K-RAS exon 2 CE Protocol Template for WAVE HS System kan downloades i Navigator Software for hurtig og nem opsætning. Gå til

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

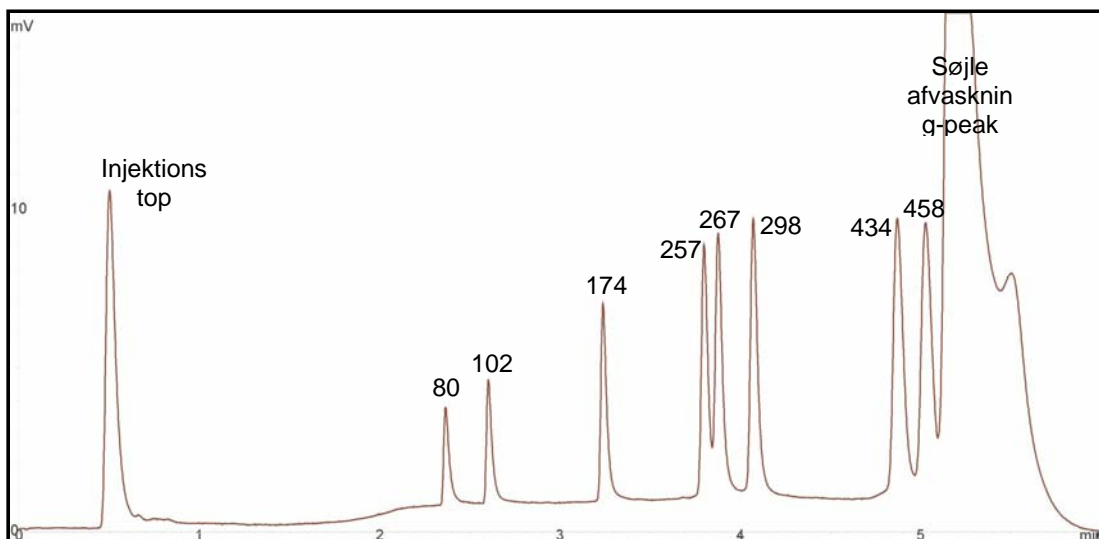
og følg installationsvejledningen for K-RAS protokollen og verifikationsprocedurer.

1. For manuel opsætning af WAVE HS System se parametrene for gradient prædiktion i **Appendiks B: WAVE HS System parametre for K-RAS protokol.**

Bemærk: vi anbefaler, at den installerede protokol bruges i præference til manuel opsætning.

2. Bemærk venligst, at for sammenlignings-/kontrolformål skal SURVEYOR Nuclease fordøjelse altid udføres på begge kontroller (wild-type og positive kontroller) og prøve-DNA'er og køres i samme WAVE System tray.
3. WAVE DNA Sizing Standard (PN 560078) kan endvidere blive kørt inden prøveanalyse for at sikre, at WAVE System fungerer korrekt. En blindprøvekørsel (0 µL injektion) skal køres med

K-RAS Exon 2 Gradienten. Derefter skal 8 µL af WAVE DNA Sizing Standard injiceres på K-RAS Exon 2 Gradienten – se **Figur 2** for forventede resultater.

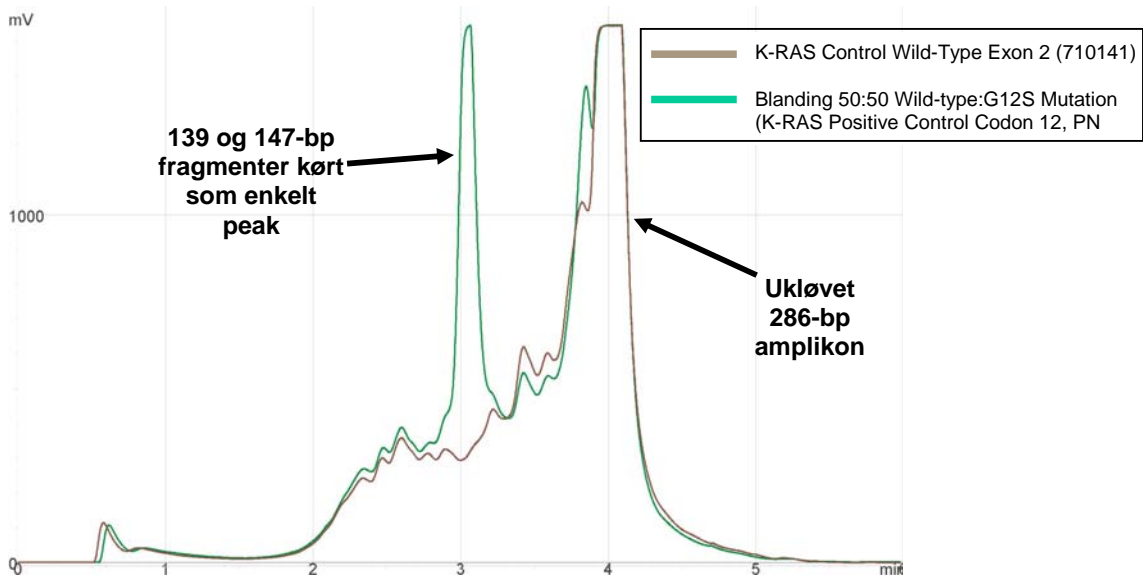


Figur 2 WAVE DNA Sizing Standard injektion ved brug af K-RAS exon 2 gradient (UV-detektion). Fragmentstørrelser er angivet i basepar.

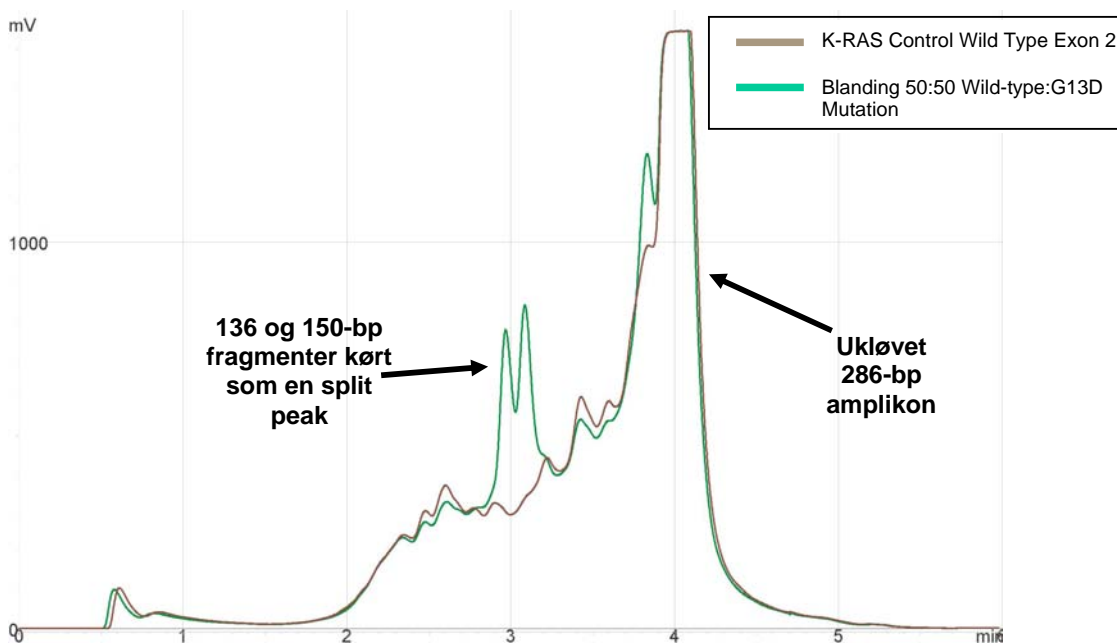
For gradientdetaljer for K-RAS Exon 2 henvises der til **Appendiks B – Gradient for K-RAS Exon 2**.

Eksempler på resultater

Eksempler på resultater opnået med SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* for WAVE HS System er vist i Figur 3 og 4 nedenfor. I disse eksempler blev processen, der er beskrevet i afsnittet Oversigt, fulgt præcist.



Figur 3 viser SURVEYOR Nuclease fordøjelsesprodukter fra 286-bp exon 2 codon 12 amplikon heteroduplexer eluerer som en enkelt peak. Template, der blev anvendt i denne PCR, var K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 og K-RAS Positive Control Codon 12. Denne G12S mutation producerer G-T og C-A heteroduplexer, der danner 139 & 147-bp fragmenter efter SURVEYOR Nuclease fordøjelse; disse fragmenters peaks resolveres ikke på denne gradient og kører som en enkelt peak. Fordøjelsesprodukter blev analyseret på et WAVE HS System.



Figur 4 viser SURVEYOR Nuclease fordøjelsesprodukter fra 286-bp exon 2 codon 13 mutation amplikon heteroduplexer eluere som en dobbelt peak. Templateerne, der blev brugt i denne PCR var K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 og K-RAS Positive Control Codon 13. Denne G13D mutation producerer G-T and C-A heteroduplexer, der danner 136 & 150-bp fragmenter efter SURVEYOR Nuclease fordøjelse; disse fragmenters peaks separerer og producerer en karakteristisk dobbelt peak. Fordøjelsesprodukter blev analyseret på et WAVE HS System.

Dette kit er designet til klart at påvise et distinkt WAVE-kurve for codon 12 og 13 mutationer; det giver brugeren mulighed for intern validering af muligheden for at udlede en prøves mutationsstatus uden behov for sekvensbekræftelse.

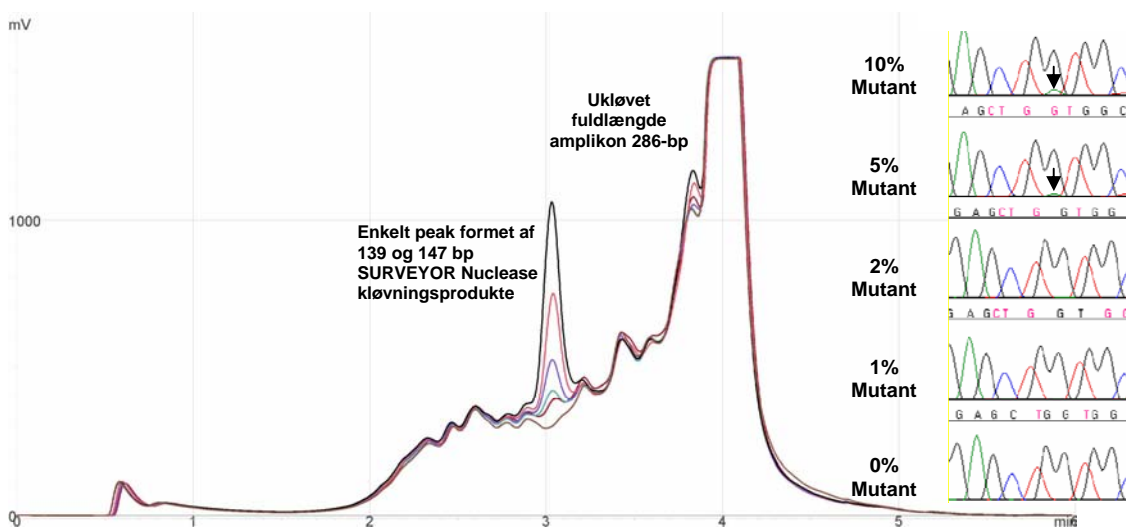
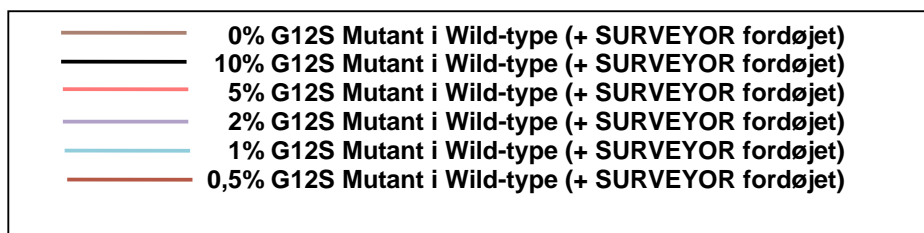
Ydelseskarakteristika

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

Validering af SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* ved brug af plasmid cloner af alle hyppigt forekommende K-RAS exon 2 mutationer har vist, at SURVEYOR Nuclease peaks kan detekteres i en blanding af 1% mutant til 99% wild-type.

Resultaterne nedenfor viser WAVE HS System-kurver af fortyndingsserier af eksempelmutationer i hver af codon 12 og 13 og sekventering-elektroferogrammer for valgte fortyndinger.

K-RAS Exon 2 G12S mutationsniveau af detektion-fortyndingsserier



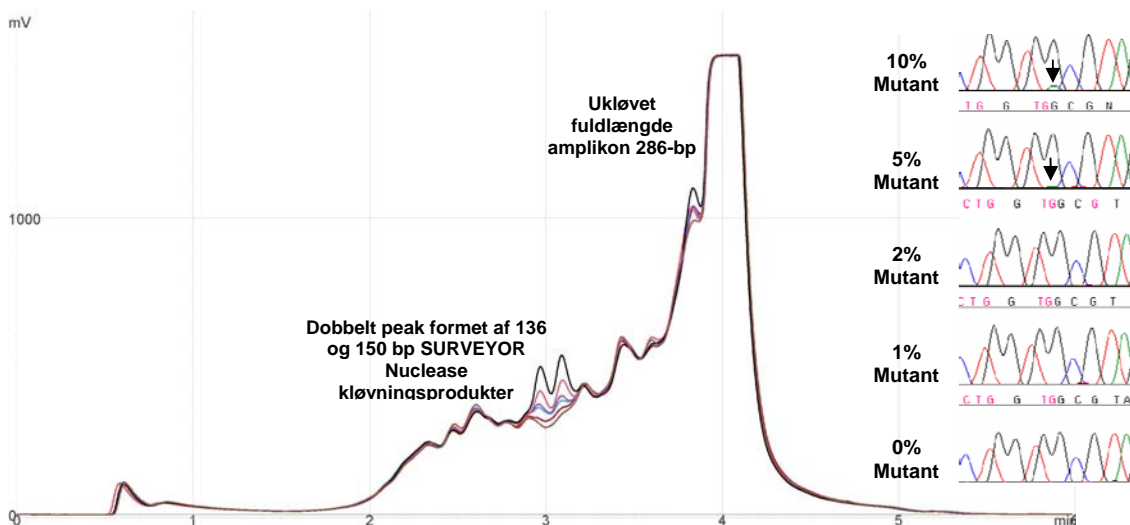
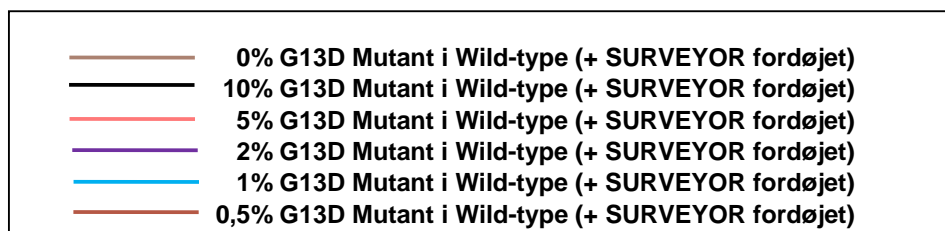
Figur 5 SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* titrering af K-RAS Exon 2 G12S mutation

Variierende mutantniveauer blev forberedt ved at blande K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 (PN 710141) og K-RAS Positive Control Codon 12 (PN 710143), og derefter opvarme og nedkøle blandingen for at danne heteroduplexer. Disse blandinger blev derefter kløvet med SURVEYOR Nuclease og analyseret på WAVE 4500 HT HS System. **BEMÆRK:** for at opnå en 90% Wild-type, 10% Mutant, blev der forberedt en blanding af 80% PN 710141 og 20% PN 710143 (se side 11). Da G12S mutationen er placeret nær midten af Exon 2 ampliconet, har de to SURVEYOR Nuclease kløvningsprodukter meget ens retentionstider og danner en enkelt peak. Bemærk også, at det meste af ampliconblandingen består af wild-type homoduplexer, der ikke kløves af SURVEYOR Nuclease. Detektionsgrænsen for G12S mutant amplicon er 1% med SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* og WAVE HS System.

Detektionsgrænse-sekventeringsresultater for K-RAS Exon 2 G12S Mutation

Elektroferogrammer viser sekventeringsresultaterne for PCR-produkter, der analyseres med SURVEYOR Nuclease. Automatiseret sekventeringsidentifikation af både forward og reverse strenge forfejer ofte at detektere G12S mutationen i blandinger med under 10% wild-type. Sammen med SURVEYOR Nuclease resultaterne er det muligt at fortolke de 5% mutant sekventeringselektroferogrammer for codon 12 med større sikkerhed.

K-RAS Exon 2 G13D mutationsniveau af detektion-fortyndingsserier



Figur 6 SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* titrering af K-RAS Exon 2 G13D mutation

Variierende mutantniveauer blev forberedt ved at blande K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 (PN 710141) og K-RAS Positive Control Codon 13 (PN 710144), og derefter opvarme og nedkøle blandingen for at danne heteroduplexer. Disse blandinger blev derefter kløvet med SURVEYOR Nuclease og analyseret på WAVE 4500 HT HS System. **BEMÆRK:** for at opnå en 90% Wild-type, 10% Mutant, blev der forberedt en blanding af 80% PN 710141 og 20% PN 710144 (se side 11). Da G13D mutationen er lidt længere fra midten af exon 2 ampliconet end G12S mutationen (se Figur 5), har de to SURVEYOR Nuclease kløvningsprodukter forskellige retentionstider og danner en dobbelt peak. Bemærk, at det meste af ampliconblandingen består af wild-type homoduplexer, der ikke kløves af SURVEYOR Nuclease. Detektionsgrænsen for G13D mutant amplicon er 1% med SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* og WAVE HS System.

Detektionsgrænse-sekventeringsresultater for K-RAS Exon 2 G13D Mutation

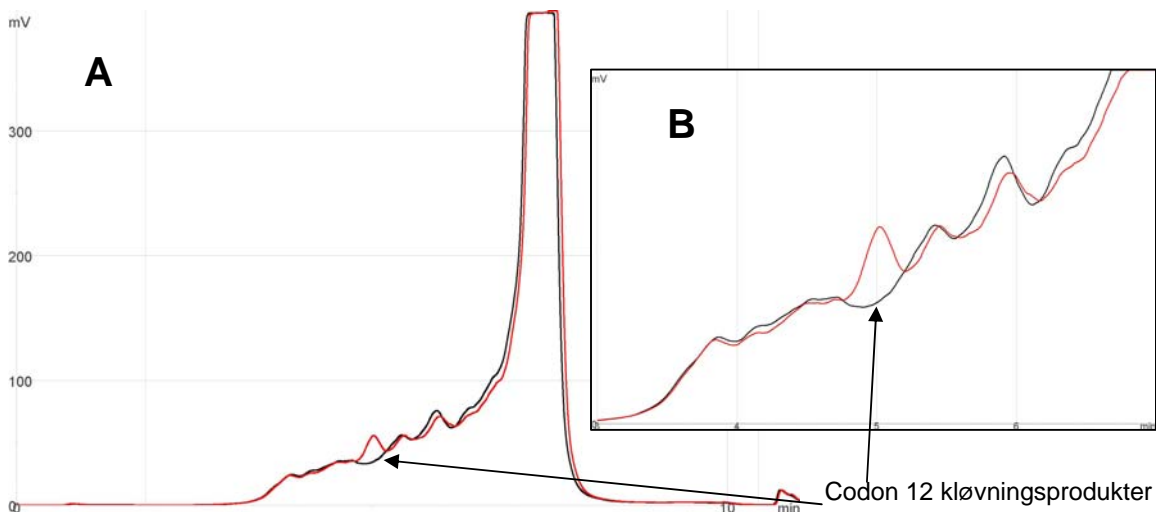
For sammenligning er der vist elektroferogrammer, der viser sekventeringsresultaternes for PCR-produkter ved de varierende mutantniveauer. Automatiseret sekventeringsidentifikation af både forward og reverse strenge forfejer ofte at detektere G13D mutationen i blandinger med under 10% wild-type. Sammen med SURVEYOR Nuclease resultaterne er det muligt at fortolke de 90:10 wild-type:mutant (5% mutation) sekventering-elektroferogrammer for codon 13 som indeholdende en mutation med større sikkerhed.

Fortolkning af lav procentdel-mutationsprøver

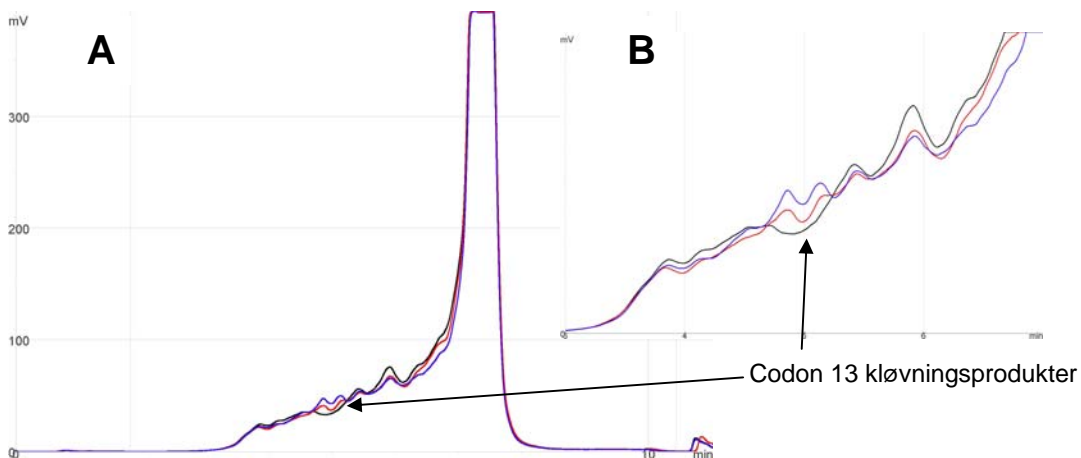
Skønt de interne og eksterne valideringsstudier af SURVEYOR Scan K-RAS Kitten har vist, at detektion af mutationer ved 1% wild-type er realistisk, afhænger dette af kvaliteten af et givet spors

baseline. Genomisk DNA eller PCR-reaktioner af ringe kvalitet, utilstrækkelige DNASep kolonnevaskeprocedurer (se Vaskeprocedure side 30) eller en suboptimal WAVE System-opsætning kan alle forårsage en mere irregulær baseline og gøre det vanskeligere at diskriminere mindre peaks i forhold til baseline.

Sporene nedenfor (Figur 7 og 8) viser de ekspanderede sporregioner med lavniveau-mutationer og negativ kontrol baselines.



Figur 7 lavniveau detektion af Codon 12 mutation. Rød linie = prøve med lavniveau codon 12 mutation. Sort linie er wild-type kontrol. Figur 7B er en forstørrelse af regionen, der viser SURVEYOR Nuclease kløvningsprodukterne. Bemærk at baselinestøjen, der har de samme amplitudepeaks som kløvningsfragmentets peaks, er konsistent mellem testen og kontrolsporene.



Figur 8 lavniveau detektion af Codon 13 mutation. Røde og blå linier = prøver med lavniveau codon 13 mutationer. Sort linie er wild-type kontrol. Figur 8B er en forstørrelse af regionen, der viser SURVEYOR Nuclease kløvningsprodukterne. Bemærk at baselinestøjen, der har de samme amplitudepeaks som kløvningsfragmentets peaks, er konsistent mellem testen og kontrolsporene.

Vi vil anbefale, at hvis der er tvivl om tilstedeværelse eller fravær af SURVEYOR Nuclease fordøjelsespeaks, skal prøveanalysen gentages med den samme genomiske DNA-template. Hvis tilstedeværelse af peaks stadig er mistænkt eller ubestemt, skal det genomiske DNA isoleres igen og reanalyseres. Anbefalinger til forbedring af signal-til-støj forhold inkluderer:

- Vælg formalin-fikseret, paraffinindlejrede væv fra objektglas på, hvilke der er en høj koncentration af tumorceller.
- Mikrodissektion for at forøge forholdet mellem tumor- og normale celler.

- Tjek at genomisk DNA opfylder de renhedskriterier, der er anført i **Templateovervejelser** på side 7.

Lav procentdel-mutationsbyrder vil være lige så svære at bekræfte med DNA-sekventering.

Analyseprocedurebegrænsninger

Kontaminerende substanser, der overføres fra ekstraktion fra formalin-fikseret, paraffinindlejrede væv, kan interferere med PCR-amplifikationen og SURVEYOR Nuclease fordøjelsesprocedurerne. De kvalitetskontrolprocedurer, der er beskrevet i Kvalitetskontrol af PCR-produkter på side 10, vil sikre, at det ekstraherede DNA er egnet til brug i dette kit.

Dette kit er blevet valideret til brug med formalinfikserede, paraffinindlejrede colorectale cancertumor-biopsiprøver. Det er ikke blevet valideret til brug med andre cancer-typer eller med friske eller frosne biopsiprøver.

For problemløsning af ikke-standard resultater og faktordetaljer, som kan påvirke denne analyse, henvises der til Problemløsningsguiden i Appendiks A nedenfor.

Man skal være omhyggelig med at undgå overførsel og krydskontaminering med dette kit. Analysemetodens ekstreme sensitivitet kræver, at der træffes forholdsregler ved de følgende punkter:

- Sørg for, at alle prøver håndteres således, at der ikke kan ske krydskontaminering prøver imellem
- Sørg for, at kittets plasmid-kontroller håndteres separat fra testprøverne på alle analysens trin
- Sørg for, at prøvepipettering i 96-brønds plader ikke tillader prøvekontaminering af tilstødende brønde pga. stænkning under blanding eller ved ikke at skifte pipettespidser.

Literaturhenvisninger

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).

Appendiks A

Problemløsningsguide

Effektiv brug af SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* afhænger af korrekt udførelse af en række trin. Et af det mest kritiske er PCR-amplifikation, der skal resultere i produktionen af specifikke DNA'er af ensartet størrelse i tilstrækkelig kvantitet til at blive detekteret efter hybridisering og kløvning. Dette er igen afhængig af kvaliteten af den oprindelige prøve. Udførelse af analysen med DNA, der ikke opfylder kvalitets- og kvantitetskriterierne, anbefales ikke.

Bemærk: Hvis det er første gang, du bruger SURVEYOR Nuclease, skal du udføre de eksperimenter, der er beskrevet i afsnittet **Sådan anvendes K-RAS Kontrol Plasmid DNA'er** (side 11) efter du har læst og forstået afsnittet Trin-for-trin vejledning (side 7). Sørg for at have resultaterne fra K-RAS Kontrol Plasmid DNA'er ved hånden, før Transgenomic Technical Support kontaktes.

Denne Problemløsningsguide dækker en række spørgsmål, som du kan komme ud for ved brug af SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* og forslag til, hvordan de kan løses.

Problem 1 – Lavt PCR udbytte eller intet PCR produkt

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Ringe kvalitet af DNA-template	Gentag rensning af DNA; evaluér den anvendte rensningsmetode.
Termocykler ikke kalibreret	Tjek kalibrering af termocykler
Ikke nok template	Forøg mængden af template.

Bemærk: Højkvalitets DNA fra FORMALIN-FIKSERET, PARAFFININDLEJREDE VÆV skal anvendes. DNA'et skal have en koncentration på 25 ng/μL, som bestemt ved absorbans ved 260 nm, have et absorbansforhold 260/280 nm på >1,8 og være >90% DNA (dvs. fri for de fleste tRNA- og rRNA-kontamineringer, som bedømt ved udseende på en agarosegel). DNA prøver skal opbevares ved -20 °C.

Analyse af DNA-template ekstraheret fra paraffinindlejret væv kræver, at der træffes adskillige forholdsregler. Det ekstraherede DNA kan behandles med uracil DNA glycosylase for at forhindre amplifikation af DNA fragmenter, der indeholder deamineret C-rester. Ofte vil en høj procentdel af det A₂₆₀ adsorberende materiale, der ekstraheres fra paraffinindlejret væv, ikke blive amplificeret særlig godt under PCR. Brug af en større mængde starting DNA vil ofte hjælpe til producere et passende amplifikationsprodukt.

Problem 2 – Flere PCR-produkter

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Annealingtemperatur er for lav	Tjek kalibrering af termocykler.

Bemærk: PCR skal producere et tilstrækkeligt højt udbytte (>20 ng/μL) af en **ENKELT** amplificeret art af den korrekte størrelse. **DNA Polymerasen og DNA Polymerase 10X PCR Bufferen, der er inkluderet i dette kit, skal bruges til PCR.** Amplikoner fra Kontroller skal fordøjes med SURVEYOR Nuclease og køres, så spurius baggrundsstøj ekskluderes ved visuel sammenligning af chromatogramprofiler (se **Eksempler på resultater** side 13, Figur 3-4). Undersøg hvert enkelt amplificeret DNA-produkt før fordøjelse med gelelektroforese eller WAVE HPLC for at sikre, det er en enkelt art af den forventede størrelse.

Problem 3 – Ingen kløvningprodukter observeret ved analyse efter SURVEYOR Nuclease behandling af heteroduplexer

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Proportion af mismatch-targetet for lav	Tjek analyse med Kontroller.
Ineffektiv dannelse af heteroduplexer	Følg korrekt hybridiseringsprocedure. Brug nyligt hybridiseret DNA i SURVEYOR Nuclease fordøjelse.
Inaktiv SURVEYOR Nuclease	Udfør Kontrolreaktion for at verificere enzymydelse.

Bemærk: SURVEYOR Nuclease kløver hovedsagligt ved mismatches i heteroduplexer. Forholdet mellem heteroduplex og homoduplex i den hybridiserede prøve vil bestemme SURVEYOR Nucleasens fordøjelsessignal. Hvis K-RAS mutationen er tilstede i en meget lav koncentration i den genomiske DNA-prøve, kan signalet være for lavt til at give et positivt resultat.

Det er vigtigt at sikre, at hybridiseringstrinnet er inkluderet i termocyklerprogrammet (se **Amplifikationsprotokol** side 9) for at maksimere effektiviteten af heteroduplexformation. Heteroduplexer dannes meget ineffektivt under standard PCR-reaktioner.

Bemærk: signal-til-støj forholdet er generelt højt nok til at detektere mutationer tilstede ved en lav procentdel af den totale DNA-template; det er muligt at detektere 1% til 2% mutant DNA. Figur 5 og 6 (side 15-16) viser detektion af K-RAS Exon 2 codon 12 og 13 mutationer tilstede (2-18% heteroduplex) med et WAVE HS system. Figur 3-4 (side 13-14) viser de fordøjelsesprodukter, der dannes med homoduplex og heteroduplex K-RAS Positiv Kontrol DNA'er (inkluderet i dette kit) på et WAVE HS System. De mutationspecifikke kløvningsprodukter ses klart som to nye peaks, der eluerer med de forventede størrelser, der kan estimeres relativt til DNA-størrelsesmarkøren.

Forsigtig: kommercielt tilgængelige PCR-buffere varierer dramatisk i indhold og formuleringerne er ofte ikke defineret af leverandørerne. Adskillige buffere er **IKKE** kompatible med SURVEYOR Nuclease pga. pH eller tilstedeværelse af additiver, surfaktanter eller andre proprietære indholdsstoffer. **DER MÅ IKKE anvendes andre polymerase eller 10X polymerase-buffere end de, der er inkluderet i kittet.**

Problem 4 – Høj baggrund efter SURVEYOR Nuclease behandling

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Suboptimalt hybridiseringstrin	Gør følgende: 1. Sørg for, at DNA-koncentrationen er i området >25 ng/µL. 2. Gentag hybridiseringstrinnet og vær omhyggelig med at følge Hybridiseringsproceduren.
DNA-mængden for lav.	Tjek udbytte og kvalitet af template-DNA
Non-specifikke PCR-produkter	Tjek udbytte og kvalitet af template-DNA.
SURVEYOR Enhancer W2 og/eller SURVEYOR Enhancer Cofactor har mistet aktivitet	Tjek kittets udløbsdato.

Bemærk: SURVEYOR Nuclease kan sommetider bryde (nick) dobbeltstrenget DNA på tilfældigt matchede steder, hvilket producerer baggrund efter fordøjelse¹⁸. Denne aktivitet undertrykkes af SURVEYOR Enhancer W2 og dets cofactor uden nogen anden negativ indvirkning på mismatch-kløvningsreaktionen. SURVEYOR Enhancer W2 og SURVEYOR Enhancer Cofactor er inkluderet i dette kit og skal altid anvendes.

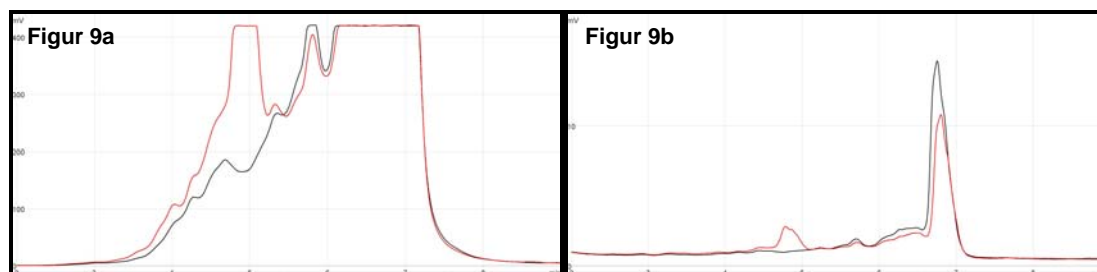
Hvis denne brydning (nicking) stadig forekommer og genererer mindre peaks, vil en sammenligning af kontrolfordøjelser af homoduplexer med prøvefordøjelser gøre det muligt at genkende og normalisere disse med Navigator Software.

Problem 5 – SURVEYOR Nuclease fordøjelsespeaks i negative kontroller

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Kontaminering af kitindhold med K-RAS amplikoner eller plasmid-kontroller.	Bortskaf alle kitkomponenter og brug et nyt kit. Kontakt Transgenomic Technical Support for at diskutere potentielle kontamineringsårsager og -kilder.

Problem 6 – Toppe af SURVEYOR Nuclease fordøjelse-peaks afskåret på WAVE HSD fluorescerende spor

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Den højsensitive detektor har en intern feedback-algoritme, der monitorer mængden af lys, der går gennem flowcellen. Jo mere lys, der går ind i flowcellen, jo lavere er detektorens cut off-værdi (mV), men jo højere er sensitiviteten.	En ændring af emissionsbølgelængden ville løse dette problem, men det sker på bekostning af sensitivitet. Vi anbefaler, at der henføres til UV-detektorens chromatografiske spor. Hvis de fluorescerende detektorpeaks er afskåret i chromatogrammet, vil UV-sporet give et klart læsbart signal. Se eksempler i Figur 9a og 9b nedenfor. Alternativt kan en mindre mængde prøve reinjiceres og intensiteten af det fluorescerende signal skulle reduceres.



Figur 9a og 9b. Hvis der findes afskårne peaks ved brug af HSD Fluorescent Detector, kan UV Detektorens output også bruges til prøveanalyse

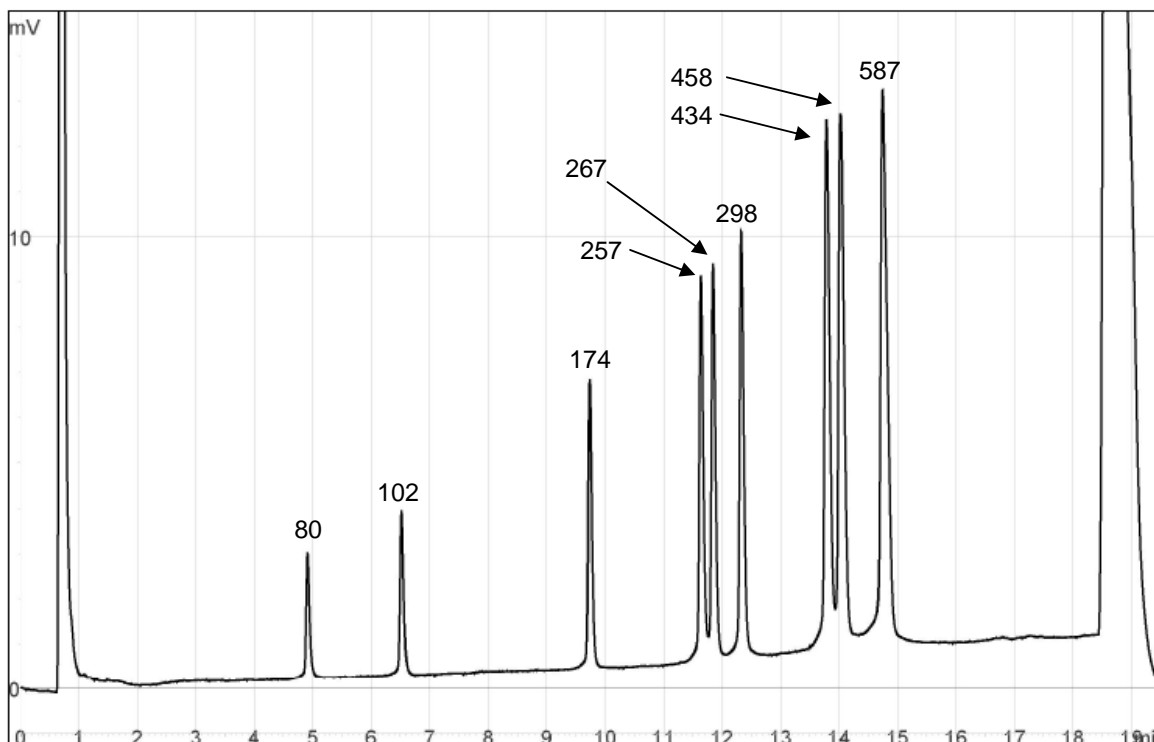
Sporene ovenfor viser de samme genomiske DNA-prøvers output fra både Fluorescent (9a) og UV- (9b) detektorer. I begge figurer er den røde linie en G12V mutationsprøve; den sorte linie er en wild-type referenceprøve. Den høje kvantitet af DNA loaded og analyseret ved hjælp af den fluorescerende detektor i Figur 9a fører til afskårne peaks for både homoduplex og SURVEYOR Nuclease fordøjelsespeaks. De tilsvarende UV-detektor kurver viser SURVEYOR Nuclease fordøjelsespeaks helt tydeligt, såvel som de uafskårne homoduplex peaks.

Appendiks B

WAVE System INDLEDENDE opsætning/søjlekalibrering (Navigator Software) for SURVEYOR Nuclease applikationer

1. Der må kun bruges WAVE Optimized buffers.
2. Gennemskyl Buffer A og B sammen med Solution D.
3. Spæd injektionssprøjten (på frontpanel af autosampler på 3500, via software på 4500).
4. Spæd HSD-pumpen.
5. Under Setup på drop-down menubjælken vælg Module Setup.
6. Fremhæv UV detectoren i instrumentboksen.
7. Bekræft at detektor-bølgelængden er indstillet på 260 nm.
8. Fremhæv fluorescence detector i instrumentboksen.
9. Bekræft at detektorens excitationsbølgelængde er indstillet på 492 nm og at emissionsbølgelængden er indstillet på 526 nm (HS Staining Solution I).
10. Opret et nyt projekt (hvis det ønskes) eller åbn eksisterende projekt på Navigator Softwarens drop-down menu.
11. Hvis et nyt projekt blev oprettet, skal der oprettes en ny prøvebakke (sørg for, at den korrekte bakketype vælges).
12. Opret to blind-injektioner ved brug af universal linear application type.
 - a. Venstreklik på hætteglas 96 på speed platen for at fremhæve hætteglas (forudsat 96-ell tray type anvendes).
 - b. Højreklik på hætteglas for at åbne injection page.
 - c. Ændr application type til universal linear.
 - d. Ændr rengøringsoption til fast clean (hvis behørig) eller active clean.
 - e. Bekræft at ovntemperaturen er 50,0 °C i metoden.
 - f. Ændr volumen til 0 µL.
 - g. Ændr antal injektioner til 2.
 - h. Venstreklik på [Generate] knappen nederst til venstre.
13. Kør injektioner.
14. Opret tre 5 µl injektioner af WAVE DNA Sizing Standard (Transgenomic part # 560078) ved brug af den universel lineære applikationstype.
 - a. Placér WAVE DNA Sizing Standard prøven i et 0,2 mL PCR-rør i position 96.
 - b. Venstreklik på hætteglas 96 på hastighedspladen for at fremhæve hætteglas (forudsat 96-well tray type anvendes).
 - c. Højreklik på hætteglas for at åbne injection page.
 - d. Ændr application type til universal linear.
 - e. Ændr cleaning option til fast clean (hvis behørig) eller active clean.
 - f. Bekræft at ovntemperaturen er 50,0 °C i metoden.
 - g. Ændr volumen til 5 µL.
 - h. Ændr antal injektioner til 3.
 - i. Venstreklik på [Generate] knappen nederst til venstre
15. Kør injektioner.

16. Når kørslerne er fuldført, skal chromatogrammerne kontrolleres for at sikre retentionstidstabilitet for 80- og 587-bp peaks.
 - a. Retentionstid for 80-bp peaken og 587-bp peaken for WAVE DNA Sizing Standarden skal være indenfor 0,1 min fra kørsel-til-kørsen.
17. Foretag søjlekalibrering, før der køres rigtige prøver.
 - a. Under Analysis-fanebladet klik på [Select Results] knappen.
 - b. Find den tredje injektion af WAVE DNA Sizing Standarden. Åbn projektet og bakken med filnavigationen til venstre og brug derefter injection-displayet til højre for at finde injektionen.
 - c. Fremhæv den tredje WAVE DNA Sizing Standard injektion og klik derefter på [Add Selected Results] knappen.
 - d. Højreklik på chromatogrammet.
 - e. Vælg [Chart].
 - f. Under Peak Labels Option (mærkatoption) vælg Peak Labels Box (mærkatboks) og brug drop-down menuen til at vælge [Peak Retention Time].
 - g. Klik på [Apply].
 - h. Klik på [OK].
 - i. Brug menubjælken og Opsætning (Setup) drop-down menuen og vælg [Cartridge Calibration].
 - j. Indlæs de retentionstid-værdier, der er vist på chromatogrammet for den tilsvarende peak for WAVE DNA Sizing Standarden.
 - k. Vælg [Plot New Calibration].
 - l. Vælg [Accept New Calibration].



Figur 10. Typisk WAVE DNA Sizing Standard analyse ved brug af Universal Linear Method type fra Navigator Software (WAVE 4500 HT HS eksempel).

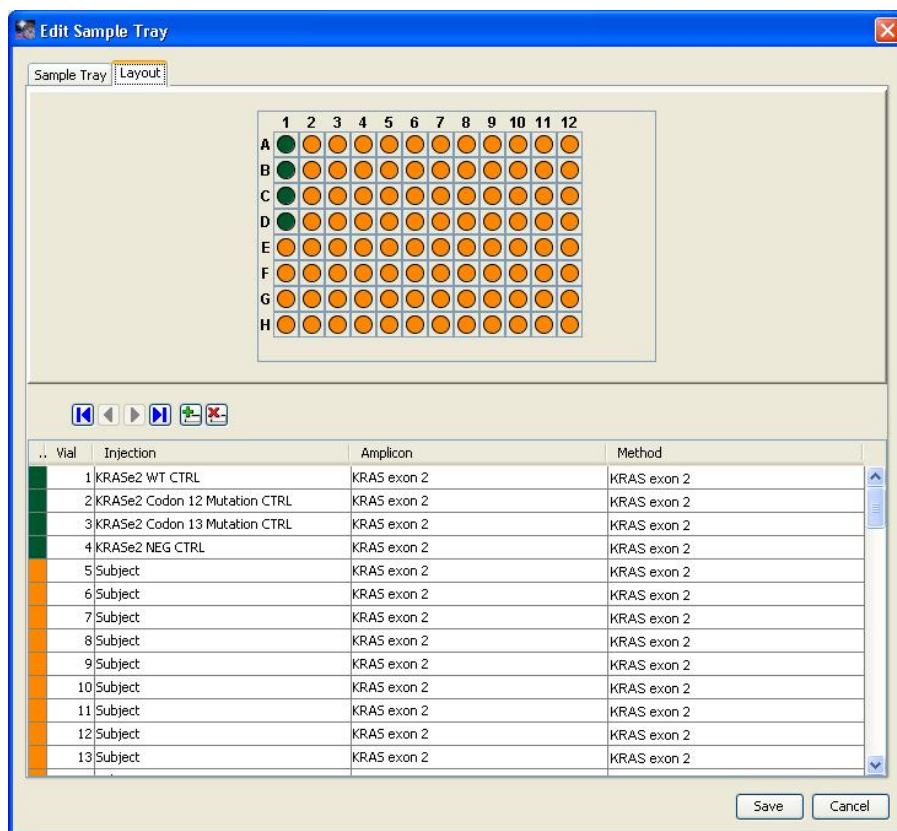
WAVE HS System parametre for K-RAS Protokol

Vi anbefaler, at K-RAS exon 2 CE Protokol-templateen downloades i Navigator Softwaren. Den henvises til K-RAS Installation Guide på:

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

For manuel opsætning af WAVE HS System, eller for at tjekke for korrekt installation af K-RAS exon 2 CE Protocol Template, henvises der til de følgende parametre for gradient prædiktion:

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

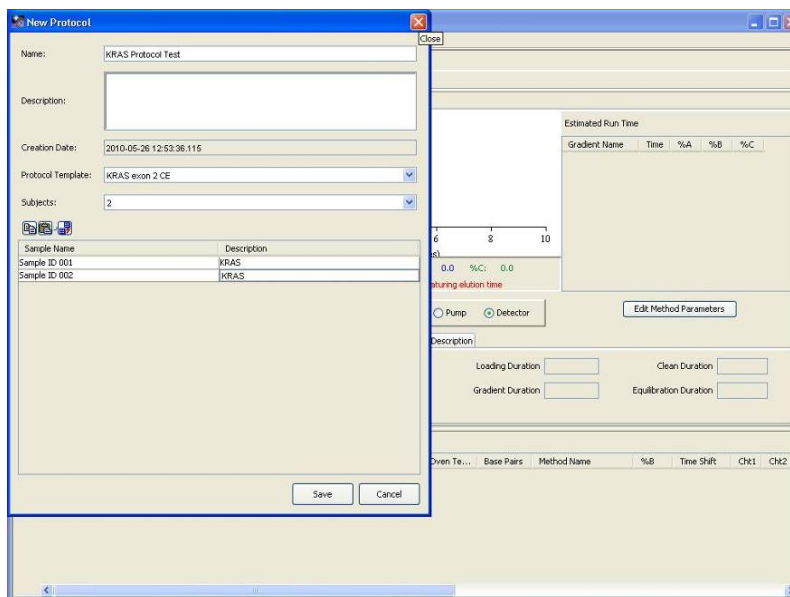


Figur 11 Skærmbillede af pladeopsætning; 92 prøver og kontroller

K-RAS exon 2 CE Protocol Template populerer injektionstabellen som vist ovenfor. I alt 92 Exon 2 prøver (orange brønde) kan analyseres på en enkelt plade. Der køres ligeledes tre kontroller for exon 2 (grønne brønde) og en negativ kontrol for hver plade.

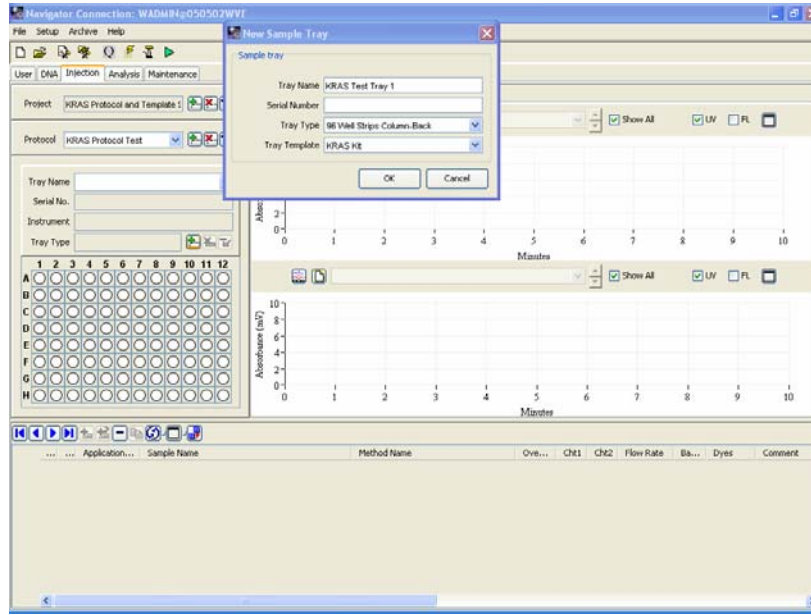
Bemærk, at injektionstabellen er opstillet i kolonneformat.

- K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 er placeret i hætteglas 1 (A1 i injektionstabellen).
 - K-RAS Positive Control Codon 12 er placeret i hætteglas 2 (B1 i injektionstabellen).
 - K-RAS Positive Control Codon 13 er placeret i hætteglas 3 (C1 i injektionstabellen).
 - Den negative kontrol (intet DNA tilsat) er placeret i hætteglas 4 (D1 i injektionstabellen).
1. For at oprette en ny protokol gå til [File] fra drop-down menubjælken og vælg [Protocol], og derefter [Template].



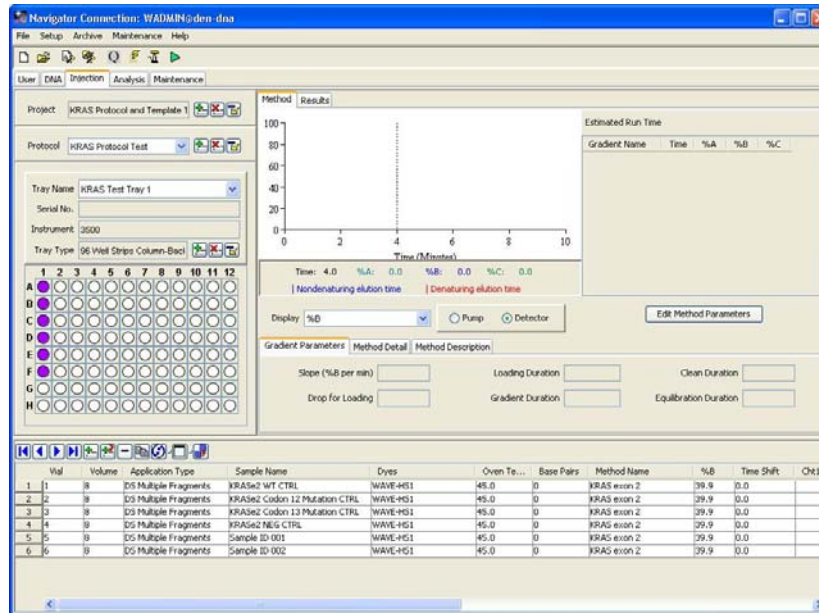
Figur 12 Opsætning af ny protokol

- a) Navngiv protokollen.
 - b) Kontrollér at Protocol Template er "KRAS Exon 2 CE".
 - c) Indtast antallet af Subjects/Samples, der skal analyseres.
 - d) Indlæs unikke Sample Names for hver enkelt af Samples og vælg [Save].
2. For at oprette injektionstabellen skal der vælges en ny Tray Type.
 - a) Indlæs Tray Name.
 - b) Vælg Tray Type. Tray Type skal være i kolonneformat. Hvis der ikke er en bakke tilgængelig, henvises der til Navigator Manualen for problemløsning.
 - c) Vælg K-RAS Kit Tray Template og vælg [OK]



Figur 13 Opsætning af en ny prøvebakke

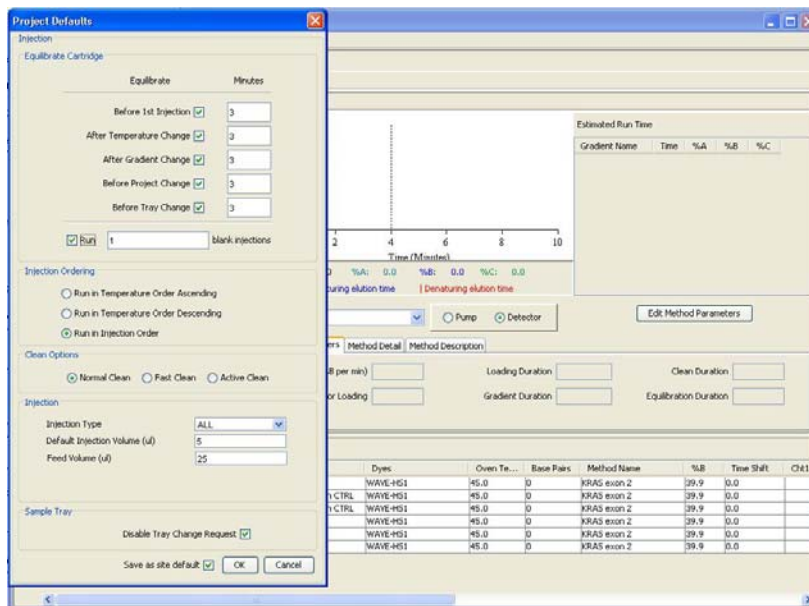
Bakketabellen vil herefter blive populeret.



Figur 14 A Populeret prøvebakke

3. Skærbilledet ovenfor viser population af injektionstabellen med K-RAS exon 2 CE template til analyse af 2 prøver.
4. Prøve 1 for K-RAS exon 2 skal placeres i position E1 (hætteglas 5).

5. For at bringe HSD-pumpen til driftstryk, såvel som at ækvilibrere system, skal en blindinjektion køres inden prøveanalyse. For at gøre dette:
 - a) Under [Setup] på drop-down menuen, vælg [Project Defaults].
 - b) Sæt hak i Run/boksen under Equilibrate Cartridge. En blindinjektion er tilstrækkelig.



Figur 15 Kørsel af en blindinjektion

6. Hætteglas 96 (position H12) kan bruges til WAVE DNA Sizing Standard. Navigator Software Protocol-funktion kan ikke bruges til at generere injektioner for sizing standarden på hver af de gradienter, der bruges til K-RAS analyse. For at oprette injektioner af sizing standarden skal der duplikeres to rækker fra den injektionstabel, der bruger K-RAS exon 2 CE metoden. Ændr Sample Name til Sizing Standard.
7. Fremhæv de to prøverække med sizing standarden og kørs de to valgte injektioner. Tryk på kørs (run) knappen igen for at kørs resten af prøverne (alle injektioner i bakke). En blindinjektion vil blive kørt inden sizing standarderne.

Gradient for K-RAS Exon 2

(maksimal fragmentlængde = 400 bp)

Trin	Tid	%A	%B
Loading	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

Vedligeholdelse af DNASep HT Cartridges

Vaskeprocedure

Når SURVEYOR Nuclease fordøjelse injiceres på DNASep HT Cartridges i et WAVE System, er de anbefalede rengøringsoptioner enten ACTIVE CLEAN eller FAST CLEAN. **En normal rengøring er ikke tilstrækkelig.**

Bemærk følgende:

- Hver 100 injektioner af SURVEYOR Nuclease fordøjelse skal efterfølges af en VARM VASK (HOT WASH). En VARM VASK udføres ved 80 °C pumpning af 100% Solution D (75% (v/v) ACN) i 15 minutter, efterfulgt af en vask med 1:1 blanding af WAVE Optimized Buffers A og B i 30 minutter gennem systemet. Denne VARME VASK skal også udføres ved afslutningen af hver enkelt batch af SURVEYOR Nuclease fordøjelse-kørsler uanset hvorvidt 100 injektioner er blevet nået eller ej, f.eks. når søjlebrug midlertidigt standses eller når en ændring til DHPLC analyse forventes.
- In-line filteret skal skiftes efter hver 500 injektioner af SURVEYOR Nuclease fordøjelse. In-line filteret skal også skiftes, hvis trykket bliver for højt (>1500 PSI for DNASep HT Cartridges).
- Efter hver 500 injektioner skal der udføres en REVERSE HOT WASH. Der henvises til **Sådan udføres en REVERSE HOT WASH på en DNASep HT Cartridge** afsnittet nedenfor.

ADVARSEL! Hvis ikke disse procedurer følges, vil det medføre et højt kolonnetryk og forringet kolonneydelse.

Sådan udføres en REVERSE HOT WASH på en DNASep HT Cartridge

Udførelse af en REVERSE HOT WASH:

1. Fjern DNASep HT Cartridge og sæt den tilbage i omvendt retning i flowbanen.
2. Fjern in-line filteret og erstat det med en union under REVERSE HOT WASH.
3. Pump 100% Solution D (75% (v/v) ACN) i 30 minutter ved 80 °C gennem systemet med en flowhastighed på 0,9 mL/min.
4. Pump en vask, der består af en 1:1 blanding af WAVE Optimized Buffers A og B gennem systemet i 1 time ved 80 °C med en flowhastighed på 0,9 mL/min.
5. Fjern unionen og indsæt et nyt in-line filter.

Denne REVERSE HOT WASH skal udføres uden in-line filteret. Indsæt et nyt in-line filter efter REVERSE HOT WASH og kørs søjlelen i den modsatte retning for de næste 500 injektioner.

Kontaktoplysninger

Virksomhedens Hovedkvarter

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

Telefon: (888) 233-9283* eller +1 (402) 452-5400
Fax: +1 (402) 452-5401

E-mail: SURVEYORscan@transgenomic.com

Europa

Autoriseret repræsentant i EU

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

*Kun i Nordamerika

ISO 9001:2008 Certificering

Transgenomic Inc driver et Kvalitetstyringsystem, der opfylder kravene i ISO 9001:2008 for produktproduktion af instrumenter og bioforbrugsartikler til genetisk variation, mutationsdetektion og andre unikke biomarkøranalyser, som certificeret af BSI, certifikat # FM 538914.

www.transgenomic.com



Varemærker & copyright

Dette produkt er fremstillet under eksklusiv licens i henhold til US Patenter 6,391,557; 5,869,245; og andre patenter anmeldt. Brug af SURVEYOR Nuclease kræver en licens fra Transgenomic. Akademiske, ikke-for-profit og for-profit organisationer har begrænsede rettigheder til at bruge SURVEYOR Nuclease til forskningsformål ved erhvervelse af dette produkt. Videresalg eller anden brug er strengt forbudt. Kontakt venligst Transgenomic for yderligere information.

DNA Polymerase: Brugen af dette produkt er dækket af et eller flere af de følgende US patenter og tilsvarende patentkrav udenfor USA: 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 og krav udenfor USA, der svarer til US Patent No. 4,889,818. Erhvervelsen af dette produkt inkluderer en begrænset, ikke-overførbart immunitet mod retsforfølgelse under de førnævnte patentkrav for brug af kun denne mængde produkt for køberens egen interne forskning. Ingen rettighed under noget andet patentkrav (som f.eks. det patenterede 5' Nuclease Proces-krav i US Patent Nos. 5,210,015 og 5,487,972), ingen rettighed til at udføre nogen patenteret metode, og ingen rettighed til at udføre kommercielle services af nogen art, inklusiv uden begrænsning rapportering af resultaterne af køberens aktiviteter for et gebyr eller anden kommerciel modydelse, er kommunikeret udtrykkeligt, ved implikation, eller ved estoppel. Dette produkt er kun til forskningsbrug. Diagnostisk brug under Roche patenter kræver en separat licens fra Roche. Yderligere information om køb af licenser kan fås ved at kontakte Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

"TRANSGENOMIC", "the power of discovery", "WAVE", "SURVEYOR", "WAVE Optimized", "DNASep" og globe-logoet er registrerede varemærker og "Navigator" er et varemærke tilhørende Transgenomic, Inc. Alle andre varemærker er varemærker, der tilhører de respektive indehavere.

© 2010 Transgenomic, Inc. Alle rettigheder forbeholdes. Trykt i USA.

Dokument bestillingsnr. 482276-DA-04