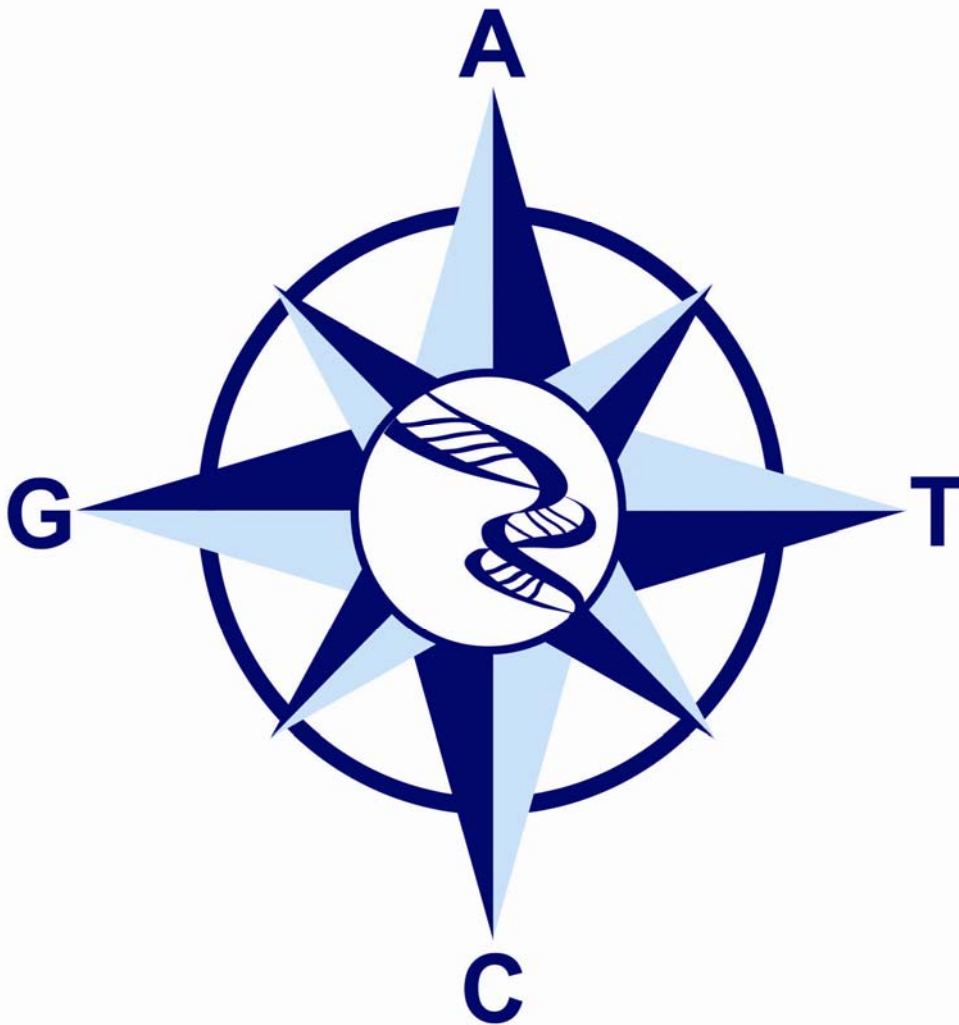




TRANSGENOMIC®

the Power of Discovery®

**Instructies Voor Gebruik Van de  
Transgenomic  
SURVEYOR® Scan K-RAS  
Mutation Detection Kit *CE IVD*  
(Nederlandse versie)**



[www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)

## Inhoudsopgave

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i> .....	2
Toepassing .....	2
Indicaties voor gebruik .....	2
Principes van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Assay.....	2
K-RAS.....	2
SURVEYOR Nuclease.....	3
Componenten .....	4
Aantal monsters dat met één set kan worden getest .....	5
DNA-sequentiëring.....	5
Extra benodigde apparatuur en reagentia .....	5
Bereiding van reagens .....	5
Opslag en houdbaarheid nadat de set voor het eerst is gebruikt.....	6
Waarschuwingen & voorzorgsmaatregelen: .....	6
Primaire monsterafname, hantering en opslag.....	6
Assayprocedure .....	6
Somatische mutatiedetectie met de SURVEYOR Scan <i>K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD</i> –	
Een overzicht .....	6
Stap-voor-stap-instructies .....	7
K-RAS Protocolinstallatie op het WAVE HS System .....	7
WAVE System INITIAL Instellings-/patroonkalibratie (Navigator Software) voor SURVEYOR	
Nucleasetoepassingen.....	7
WAVE System INITIAL Instelling/Ovenkalibratie.....	7
WAVE HT HS Overwegingen voorafgaand aan K-RAS Monsteranalyse .....	7
Template-overwegingen .....	7
Primer-overwegingen.....	8
Amplificatieprotocol.....	8
Thermocycler-programma voor amplificatieprotocol .....	9
Kwaliteitscontrole van PCR-producten.....	10
SURVEYOR Nucleasedigestie.....	10
Workflow-overwegingen.....	11
Controleprocedures.....	11
Kwaliteitscontrole van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i> .....	11
Het gebruik van K-RAS Controlplasmide-DNA's .....	12
Interpretatie van de resultaten.....	13
Analyse VAN K-RAS Exon 2 met behulp van SURVEYOR Nuclease.....	13
Voorbeelden van resultaten .....	13
Prestatiekenmerken .....	15
Detectieniveau van SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i> .....	15
K-RAS Exon 2 G12S Mutatieniveau van Detectiedilutieseries .....	15
K-RAS Exon 2 G13D Mutatieniveau van Detectiedilutieseries .....	16
Interpretatie van mutatiemonsters met een laag percentage .....	17
Bependingen van de assayprocedure .....	18
Literatuurreferenties .....	18
Bijlage A.....	21
Gids voor het opsporen en oplossen van problemen .....	21
Bijlage B:.....	24
WAVE System INITIAL Setup/Cartridgekalibratie (Navigator Software) voor SURVEYOR	
Nucleasetoepassingen.....	24
WAVE HS System parameters voor K-RAS-protocol.....	26
Gradiënt voor K-RAS Exon 2 .....	30
Onderhoud van DNASep HT Cartridges .....	31
Wasprocedure .....	31
Een REVERSE HOT WASH geven op een DNASep HT Cartridge.....	31
Contactgegevens .....	32
Handelsmerken & Copyright .....	32

## Fabrikant

SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* wordt gefabriceerd door Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, VS. Tel 1-402-452-5400.

De geautoriseerde vertegenwoordiger voor de EG is Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, VK.

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

Deze set wordt geleverd als een enkele doos die de hieronder aangegeven componenten omvat. Deze instructie voor gebruik is beschikbaar als een download.

## Toepassing

*Uitsluitend voor professioneel gebruik.* Transgenomic's SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* is een *in vitro* diagnostische assay die mutaties in Exon 2 van het K-RAS-gen detecteert. Mutaties in codons 12 en 13 worden aangegeven door distinctieve assayresultaten. Deze set is ontworpen voor gebruik in een klinisch diagnostisch laboratorium door goed getraind personeel dat DNA test dat is geëxtraheerd uit in formaline gefixeerde in paraffine ingebedde weefsels.

## Indicaties voor gebruik

Clinici kunnen de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* gebruiken om te helpen bij de beslissing of de colorectale kankertumoren al dan niet kunnen reageren op anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) therapeutica zoals Vectibix<sup>®</sup> of Erbitux<sup>®</sup>.

De SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* dient niet te worden gebruikt voor diagnose van colorectale of enige andere kanker.

De SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* geeft de aanwezigheid aan van mutaties in Exon 2 van het K-RAS-gen maar bevestigt niet de sequentie-identiteit van de mutatie. Om de exacte gedetecteerde mutatie te bevestigen, zou verdere analyse, zoals DNA-sequentiëring, noodzakelijk zijn.

Met deze set verkregen resultaten dienen door een clinicus te worden gebruikt als indicatie van de mutatiestatus van een patiënt. Andere klinische factoren dienen in overweging te worden genomen en de resultaten van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* dienen niet te worden gebruikt als de enige methode die wordt gebruikt bij het nemen van beslissingen met betrekking tot ongeacht welke behandeling van patiënten met colorectale kanker. Meer specifiek, monsters die positief testen voor een K-RAS-mutatie met deze set dienen te worden bevestigd door middel van DNA-sequentiëring.

## Principes van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Assay

### K-RAS

Onlangs ontwikkelde therapeutica die zijn gericht op de epidermal growth factor receptor (EGFR), zoals cetuximab (Erbitux) en panitumumab (Vectibix), hebben aangetoond dat zij werkzaam zijn tegen colorectale kanker. Bij bepaalde colorectale kankers werken deze geneesmiddelen echter niet goed. Circa 40% van colorectale tumoren draagt K-RAS-genmutaties en deze mutaties zijn in verband gebracht met een slechte respons op EGFR-antagonisten. K-RAS-mutatiestatus kan daarom worden gebruikt om te bepalen of een tumor al dan niet zal reageren op anti-EGFR-therapie.

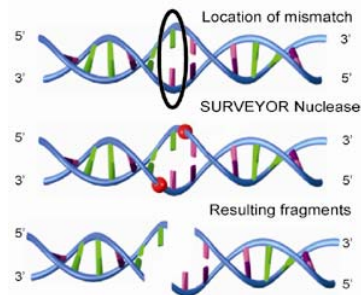
De SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* is een diagnostische set voor het detecteren van alle sequentie- en kleine insertie/deletiemutaties in Exon 2 van het K-RAS-gen.

Positieve controles worden geboden voor Exon 2-mutaties in codons 12 en 13 die in verband zijn gebracht met het ontbreken van werkzaamheid van anti-EGFR-middelen.

Deze set maakt gebruik van Transgenomic's eigen SURVEYOR Nuclease en WAVE<sup>®</sup> HS System technologieën om simpele en gevoelige mutatie detectie te geven, die in staat is een mengsel van 1% mutant te detecteren in een achtergrond van 99% niet-mutant DNA. Validatie-onderzoeken hebben extreem hoge concordantie aangetoond met sequentiëring in goed-gekaracteriseerde colorectale kankermonsters. Bovendien zijn de resulterende SURVEYOR Nuclease-digestiepatronen voor codons 12 en 13 zeer specifiek. Het gebruik van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* zal zowel de sequentiëringlast van de gebruiker verlagen als helpen bij het oproepen van agressieve sequentie waar automatische sequentiëringsoftware de aanwezigheid van een mutatie niet opheldert.

## SURVEYOR Nuclease

Transgenomic SURVEYOR Nuclease is een mismatch-specifiek plant-DNA-endonuclease dat kan scannen voor bekende en onbekende mutaties en polymorfismen in heteroduplex DNA. Het enzym knipt DNA met hoge specificiteit op locaties van base-substitutiemismatch en andere distorsies. Dit DNA-endonuclease knipt beide strengen van een DNA-heteroduplex aan de 3'-zijde van de mismatchlocatie<sup>1</sup>. Insertie/deletiemismatches en alle base-substitutiemismatches worden herkend, maar de efficiëntie van het knippen varieert met de sequentie van de mismatch<sup>1,2</sup>.



**Figuur 1. Werkwijze van SURVEYOR Nuclease.** Het endonuclease herkent een mismatch en knipt aan de 3' zijde van elke base in de mismatch. Dit knipt de DNA dubbelstreng, waardoor een enkele base 3' overhang resteert.

SURVEYOR Nuclease is gebruikt in een groot scala aan contexten om nauwkeurig een verscheidenheid aan mutaties en polymorfismen in genen te detecteren<sup>5</sup>. SURVEYOR Nuclease is met name gebruikt voor het verifiëren van de aanwezigheid van bekende mutaties in een aantal genen in verband met nierkanker<sup>3</sup>, longkanker<sup>4, 9, 10,12-15</sup>, hoofd- & halskanker<sup>6</sup>, leukemie<sup>7, 16, 17</sup>, endometriale kanker<sup>8</sup> en in radiotherapie resultaatpredictie<sup>11</sup>.

De SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* voor WAVE HS Systems is ontworpen voor het knippen van mismatches in K-RAS Exon 2 voor daaropvolgende analyse door middel van ionen-paring reverse-fase HPLC met behulp van de WAVE HS Systems.

**N.B.:** Voor deze assay dient alleen het met deze set meegeleverde DNA Polymerase te worden gebruikt.

**N.B.:** Specifiek aanbevolen wasprocedures en beschreven in deze gebruiksaanwijzing voor de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* voor WAVE HS Systems en het gebruik van DNASep HT-cartridges verschillen van de cartridges die worden gebruikt voor standaard WAVE DHPLC-procedures. Volg de specifieke aanbevelingen in deze handleiding voor het handhaven van de optimale prestatie van uw WAVE HS System.

Om deze set met succes te gebruiken adviseren wij met klem deze handleiding grondig te lezen en de gegeven instructies en richtlijnen zorgvuldig te volgen. Personen die de set voor het eerst gebruiken dienen de controle-experimenten uit te voeren die worden omschreven in het deel "Het gebruik van K-RAS Controlplasmide DNA's", pag. 11.

Wanneer u verder nog vragen hebt of hulp nodig hebt kunt u bellen naar +44 (0) 141 892 8800 (Europa) en vragen naar "K-RAS support". Als alternatief kunt u ons e-mailen op:

[SURVEYORscan@transgenomic.com](mailto:SURVEYORscan@transgenomic.com)

## Traceerbaarheid van setcontroles

De met deze set geleverde controles zijn plasmideklonen van K-RAS Exon 2-sequenties. Alle klonen zijn gesequentieerd om de getrouwheid van de sequentie te controleren door middel van vergelijking met NCBI-referentiesequentie: NG\_007524.1.

De K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 werd geconstrueerd door middel van PCR van K-RAS Exon 2 uit een wild-type genomisch DNA-preparaat en klonen.

Het K-RAS Positive Control Codon 12 werd geconstrueerd door middel van locatie-gerichte mutagenese van de K-RAS Control: Wild-Type Exon 2-kloon. DNA-sequentiëring bevestigde dat de enige verandering in de sequentie op codon 12 is met een GGT>AGT-verandering.

De K-RAS Positive Control Codon 13 werd gebouwd door middel van locatie-gerichte mutagenese van de K-RAS Control: Wild-Type Exon 2-kloon. DNA-sequentiëring bevestigde dat de enige verandering in de sequentie op codon 13 is met een GGC>GAC-verandering.

Zie **Het gebruik van K-RAS Controlplasmide DNA's** op pag. 11 voor meer bijzonderheden over DNA-sequenties van controles.

## Componenten

De SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* bestaat uit een doos met 16 buizen reagens in deze set; in elke doos zitten 4 lege holtes.

Catalogusnummer	Component	100-Reactieset (710101-CEIVD) Geleverd volume
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 buizen)	2 x 250 μL
710151R	K-RAS Primer: Exon 2 Reverse (10 μM) (2 buizen)	2 x 250 μL
710160	SURVEYOR Nuclease W (2 buizen)	2 x 105 μL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	105 μL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	105 μL
708027	0,15 M MgCl <sub>2</sub> 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	Gebruikersgids	Downloaden van de website*

[http://www.transgenomic.com/pd/surveyor/SurveyorKRAS\\_CEIVD\\_ug.asp](http://www.transgenomic.com/pd/surveyor/SurveyorKRAS_CEIVD_ug.asp)

## Aantal monsters dat met één set kan worden getest

De SURVEYOR Scan *K-RAS* Mutation Detection Kit *CE IVD* is ontworpen voor het testen van 100 reacties. Het totale aantal monsters dat kan worden getest is afhankelijk van de gemiddelde batch-grootte van op enig moment geteste monsters. Dit komt doordat één set controles moet worden getest met monsters in elke monsterbatch.

De onderstaande tabel toont het aantal monsters dat kan worden geanalyseerd met de K-RAS-set, afhankelijk van de gemiddelde batch-grootte. Dit wordt berekend op de basis dat er voor elke run 4 controles nodig zijn en een limiet van 100 reacties per set.

Wanneer de batch-grootte wordt verhoogd, wordt het aantal monsters dat in één set kan worden getest verhoogd, waardoor de gemiddelde reagentiekosten per monster worden verlaagd.

Batchgrootte	Aantal controles + monsteramplicons	Tests per Run	Totaal aantal runs per set	Per set geteste monsters
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-sequentiëring

Indien nodig worden er voldoende primers geleverd voor PCR-amplificatie van K-RAS Exon 2 om ook te worden gebruikt bij DNA-sequentiëring van alle geteste monsters.

## Extra benodigde apparatuur en reagentia

Extra componenten en apparatuur die nodig zijn voor het gebruik van de SURVEYOR Scan *K-RAS* Mutation Detection Kit *CE IVD* omvatten het volgende:

WAVE System (hetzij model 3500HT of 4500HT), WAVE HSD Accessoire, DNASep HT Cartridge (Transgenomic PN DNA-99-3710), WAVE Optimized<sup>®</sup> Buffers (Buffer A, Buffer B en Solution D zijn respectievelijk Transgenomic PN 553401, 553402 en 553412; Syringe Wash Solution [voor model 3500-systemen] en HS Staining Solution zijn respectievelijk PN 553411 en 553442), 0,2 ml-PCR-buizen, 2,0 ml-microcentrifugebuizen, micropipetten, pipettips, WAVE DNA Sizing Standard (Transgenomic PN 560078), 100-bp DNA-massaladder, moleculaire biologieklaas water, ijsbad, vortexer, microcentrifuge, thermocycler, agarosegels en agarosegel-elektroforeseapparatuur.

## Bereiding van reagens

Alle met deze set geleverde reagentia zijn klaar voor gebruik. Sommige componenten zullen vóór gebruik moeten worden ontdooid, gevortexed of worden gecentrifugeerd in een microcentrifuge;

controleer bijzonderheden in de hieronder vermelde assayprocedure. Reagentia dienen te worden gecombineerd voor het produceren van stammengsels en reactiemengsels; volledige bijzonderheden worden gegeven in de onderstaande assayprocedure – zie pag. 6.

## Opslag en houdbaarheid nadat de set voor het eerst is gebruikt

De set dient tot gebruik te worden bewaard bij temperaturen tussen de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  en  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in een vriezer met constante temperatuur. Let op de uiterste gebruiksdatum van elke ontvangen set. Gebruik de set niet nadat de uiterste gebruiksdatum is verstreken.

Het in Stap 7 van SURVEYOR Nucleasedigestie (pag. 10) bereide SURVEYOR Nucleasemengsel dient onmiddellijk te worden gebruikt daar SURVEYOR Nuclease W na verloop van tijd inactief wordt wanneer het in aanwezigheid van de andere SURVEYOR Nucleasereactiemengselcomponenten is.

## Waarschuwingen & voorzorgsmaatregelen:

In de geleverde hoeveelheden vormen geen van de in deze set aanwezige reagentia een gevaar voor de gezondheid. Transgenomic MSD-710101-CEIVD kan worden gedownload van

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

Deze set bevat geen stoffen van dierlijke of menselijke oorsprong die een infectierisico vormen.

Deze set dient alleen te worden gebruikt door die personen die zijn getraind in de toepasselijke laboratoriumtechnieken. Tijdens het werken met de componenten van deze set dient men altijd een geschikte labjas, wegwerphandschoenen en oogbescherming te dragen. Na gebruik dienen de setcomponenten te worden weggegooid als klinisch afval en in overeenstemming met uw plaatselijke voorschriften.

Delen van reagentia die uit buizen in deze set zijn gepipetteerd zijn uitsluitend bedoeld voor eenmalig gebruik. Na 25 cycli van invriezen en ontdooien zijn de componenten van deze set gevalideerd als nog steeds stabiel. Gebruik deze set niet wanneer dit aantal cycli van invriezen en ontdooien is overschreden.

## Primaire monsterafname, hantering en opslag

De SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* heeft DNA nodig dat is geëxtraheerd uit in formaline gefixeerde in paraffine ingebedde colorectale kankertumormonsters. Om te voldoen aan belangrijke kwaliteitscontrolewaarden voor een succesvol gebruik van deze set, dient het geëxtraheerde DNA te voldoen aan de volgende normen:

- Q-PCR van het geëxtraheerde DNA dient aan te geven dat er te amplificeren template is.
- De 260/280 absorptieratio dient  $>1,80$  te zijn.
- De templateconcentratie voor elk monster dient  $25\text{ ng}/\mu\text{L}$  te zijn.

Geëxtraheerde DNA-monsters die niet voor onmiddellijke analyse met deze set zijn bedoeld dienen te worden opgeslagen bij  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Assayprocedure

### Somatische mutatiedetectie met de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* – Een overzicht

Mutatiedetectie en bevestiging met SURVEYOR Nuclease houdt vier stappen in:

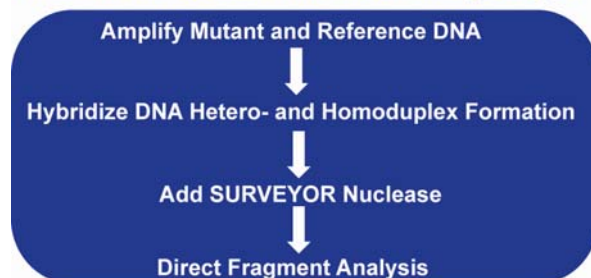
**Stap 1** – Bereid PCR-amplicons uit mutant (test) en normaal (referentie) DNA.

**Stap 2** – Als vervolg op de laatste PCR-amplificatiecyclus wordt de reactie verhit om alle dubbele strengen te smelten en vervolgens langzaam afgekoeld voor een optimale vorming van hetero- en homoduplexen.

**Stap 3** – Behandel het uitgegloeide heteroduplex-/homoduplexmengsel met SURVEYOR Nuclease. Het referentie-DNA alleen, dat op dezelfde manier wordt behandeld, doet dienst als achtergrondcontrole.

**Stap 4** – Analyseer de DNA-fragmenten met het WAVE HS System. De vorming van nieuwe knipproducten, als gevolg van de aanwezigheid van één of meer mismatches, wordt aangegeven door de aanwezigheid van extra pieken. De retentietijden van de knipproducten geven de grootte van de fragmenten aan en daarom de locatie van de mismatch of mismatches.

### Mutation Detection in Four Easy Steps



## Stap-voor-stap-instructies

### K-RAS Protocolinstallatie op het WAVE HS System

Voor snelle en gemakkelijke instelling kan het K-RAS Exon 2 CE protocol voor het WAVE HS System worden gedownload in Navigator™ Software. Ga naar:

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

en volg de instructies voor installatie van de K-RAS-protocol- en verificatieprocedures.

### WAVE System INITIAL Instellings-/patroonkalibratie (Navigator Software) voor SURVEYOR Nucleasetoepassingen

Raadpleeg **Bijlage B - WAVE System INITIAL Instelling-/patroonkalibratie (Navigator Software) voor SURVEYOR Nucleasetoepassingen** in deze handleiding voor de gebruiker.

### WAVE System INITIAL Instelling/Ovenkalibratie

Zie de WAVE Operator's User Manual voor de ovenkalibratieprocedures. **Wij adviseren maandelijkse kalibraties uit te voeren.**

### WAVE HT HS Overwegingen voorafgaand aan K-RAS Monsteranalyse

1. Voorafgaand aan het draaien van monsters dient de WAVE DNA Sizing Standard te worden gedraaid op de K-RAS-gradiënt (**Bijlage B – Gradiënt voor K-RAS Exon 2**) om correcte functionaliteit van het systeem zeker te stellen.

### Template-overwegingen

1. Gebruik voor FFPE-geïsoleerd template-DNA normale laboratoriumprocedures om de kwaliteit en kwantiteit van geëxtraheerd DNA te bepalen om zeker te stellen dat er te amplificeren template is voor PCR.
2. De 260/280 absorptieratio dient >1,80 te zijn.
3. Om de PCR-instelling te bevorderen dient de werkende templateconcentratie voor elk monster 25 ng/μL te zijn. Verdun het template-DNA indien nodig in moleculair biologieklaar water.

## Primer-overwegingen

- De sequenties van de in deze set geleverde primers zijn als volgt:

Amplicon		Sequentie
Exon 2	Forward	<b>cggGTTTGTATTA</b> AAAAGGTACTGGTGGAGT
	Achteruit	<b>cgggTTTATCTGTATCAAAGAATGGTCCT</b>

**N.B.:** De primers bevatten kleine GC-klemmen. Het 5'-uiteinde van Exon 2 is zeer rijk aan AT.

- De amplicon-sequenties zijn als volgt:
  - Forward-primers zijn gemarkeerd in **Groen**. Reverse-primers zijn gemarkeerd in **Rood**. Coderingsregio's zijn gemarkeerd in **Grijs**. De voorkomende mutatieregio's zijn gemarkeerd in **Paars**. Niet-gemarkeerde hoofdletters zijn niet-coderende cDNA-regio's.

### K-RAS Control: Wild Type Exon 2

MD Loci: 10428 - 10706

Grootte: 286 bp

**cgggtttgtattaaaagggtactggaggag**tattgatagtgattaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattatattt  
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGCCGTA**  
**GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATC**  
**CAACAATAGAG**gtaaatctgttttaatatgcatattactggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

## Amplificatieprotocol

- De Transgenomic voorgemengde dNTP-oplossing (PN 703065) wordt geleverd in een werkconcentratie van 10 mM totale deoxynucleotide (2,5 mM van elk van de vier deoxynucleotiden).
- De forward- en reverse-primers (respectievelijk PN 710151F en 710151R) voor elke amplicon worden geleverd bij 10 µM.
- Neem 10 µM primers, 10 mM voorgemengde dNTP-oplossing en DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) uit de vriezer en laat dit op ijs ontdooien.
- Bereid stammengsel op ijs.
- Gebruik de volgende tabel als richtlijn voor het bereiden van het stammengsel voor K-RAS Exon 2:

<b>Aantal reacties:</b>	<b>1.00</b>
<b>Volumeberekening:</b>	
Watervolume (µL)	<b>33.0**</b>
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	<b>5.0</b>
dNTPs (µL)	<b>4.0</b>
K-RAS Primer Exon 2 Forward (µL)	<b>2.5</b>
K-RAS Primer Exon 2 Reverse (µL)	<b>2.5</b>
DNA Polymerase (µL)	<b>1.0</b>
Totaal volume stammengsel:	<b>48.0</b>
Volume van toe te voegen geëxtraheerd DNA (µL bij 25 ng/µL)	2.0**
Totaal volume voor PCR-reactie:	<b>50.0</b>

\*\*N.B.: voor geëxtraheerde DNA-concentraties van <25 ng/µL, het volume van geëxtraheerd DNA proportioneel verhogen en ook het watervolume met dezelfde hoeveelheid verlagen in

het stammengsel met als resultaat 50 µL per reactie. Alle met dit stammengsel bereide monsters dienen verdund geëxtraheerd DNA te hebben tot ongeveer dezelfde laagste concentratieniveaus. Het gebruik van geëxtraheerde DNA-concentraties van <5 ng/µL wordt afgeraden.

6. Bereken benodigde volumes voor stammengsel door het vermenigvuldigen van volumes die in de bovenstaande tabel worden getoond met het totale aantal te analyseren monsters plus 4 extra reacties voor de controles.
7. Voorzie 0,2 mL-PCR-buizen of wells van een 96-wellsplaat van een etiket met de juiste monsterinformatie.
8. Voorzie een 2,0 mL-centrifugebuis voor bereiden van stammengsel van een etiket.
9. Voeg het gewenste volume moleculaire-biologieklasse water toe aan de 2,0 mL-centrifugebuis met het etiket stammengsel.
10. Vortex DNA Polymerase 10X PCR Buffer gedurende ~ 10 s.
11. Voeg de benodigde hoeveelheid DNA Polymerase 10X PCR Buffer toe aan de 2,0 mL-centrifugebuis.
12. Vortex 10,0 mM voorgemengde dNTP-werkoplossing gedurende ~ 10 s.
13. Voeg de benodigde hoeveelheid van de 10,0 mM voorgemengde dNTPs werkoplossing toe aan de 2,0 mL-centrifugebuis.
14. Voeg de benodigde hoeveelheid van de K-RAS Primer: Exon 2 Forward toe aan de 2,0 mL-centrifugebuis.
15. Voeg de benodigde hoeveelheid van de K-RAS Primer: Exon 2 Reverse toe aan de 2,0 mL-centrifugebuis.
16. Neem DNA Polymerase (PN 703310) uit de vriezer.
17. Centrifugeer DNA Polymerase gedurende ~10 s.
18. Vortex de DNA Polymerase gedurende ~10 s.
19. Voeg het benodigde volume DNA Polymerase toe aan de 2,0 mL-centrifugebuis.
20. Doe een dop op de 2,0 mL-centrifugebuis met stammengsel.
21. Vortex de 2,0 mL-centrifugebuis gedurende ~30 s voorafgaand aan gebruik.
22. Bewaar tot gebruik op ijs.
23. Pipetteer 48,0 µL stammengsel in geschikte wells, vervang pipettips tussendoor bij gebruik van een pipet met enkel kanaal. Zorg er bij gebruik van een herhalingspipetter voor dat er van de ene well naar de andere niet wordt gemorst/gespetterd. Houdt de plaat op ijs.
24. Voeg 2,0 µL van elk monstertemplate-DNA, elk controletemplate-DNA (PN 710140, 710143, 710144) of templatevrije controle (water) toe aan de betreffende wells.
25. Doe, zodra u klaar bent met pipetteren, op elke well een dop met de 8-dopsstrips (wanneer u een 96-wellsplaat gebruikt) of doe een dop op de 0,2 mL-PCR-buizen. Controleer of de doppen goed zijn gesloten.
26. Vortex (~1/2 toerental) gedurende 30 s.
27. Inspecteer de platen of 0,2 mL-PCR-buizen. Verifieer of de oplossing onderin de well zit. Centrifugeer wanneer dat niet het geval is. Na het centrifugeren het toerental van de centrifuge verlagen en gedurende ~15 s mengen.

### **Thermocycler-programma voor amplificatieprotocol**

1. Gebruik het volgende thermocyclerprotocol voor PCR-amplificatie en heteroduplexvorming:

Eerste denaturering	95 °C	5 min
15 cycli touchdown	95 °C	30 sec
	62 °C, -0.5 °C/ cyclus	30 sec

	72 °C	25 sec
30 cycli amplificatie	95 °C	30 sec
	55 °C	30 sec
	72 °C	25 sec
Eindextensie	72 °C	2 min
Heteroduplexvorming	95 °C	2 min
	4 °C	Aanhouden

### Kwaliteitscontrole van PCR-producten

1. Amplicon-kwaliteit en –kwantiteit dienen te worden gecontroleerd door middel van gelelektroforese of WAVE DHPLC alvorens door te gaan naar SURVEYOR Nucleasedigestie.
2. Analyseer een deel van het PCR-product samen met een aantal verschillende hoeveelheden van een 100-bp DNA-massaladder.
3. Gebruik de ladder om de concentratie van het geamplificeerde DNA te bepalen.
4. Er mag slechts een enkele band >20 ng/µl die overeenkomt met het hoofdproduct te zien zijn.
5. Wanneer er meerdere banden aanwezig zijn, controleer dan of het inputtemplate-DNA voldoende was (zie **Bijlage A – Gids voor het opsporen en oplossen van problemen**).
6. Wanneer geen product is geobserveerd, controleer dan of de kwaliteit van het inputtemplate-DNA voldoende was (zie **Bijlage A – Gids voor het opsporen en oplossen van problemen**). Wanneer de kwaliteit voldoet aan de specificaties, verhoog dan het templatevolume tot 4,0 µL per 50 µL reactie (verminder het water per reactie tot 31,0 µL).
7. Er mogen geen PCR-producten zichtbaar zijn in het geen-template-controlemonster. Wanneer er DNA-producten zichtbaar zijn, is bij deze controle verontreiniging waarschijnlijk; zie de Gids voor het opsporen en oplossen van problemen, pag. 21.

### SURVEYOR Nuclease digestie

1. Nadat het monster-PCR van voldoende kwaliteit en kwantiteit wordt geacht, voert u de SURVEYOR Nucleasedigestiereactie op de hieronder beschreven wijze uit.
2. Ontdooi de 0,15 M MgCl<sub>2</sub> Solution en SURVEYOR Enhancer Cofactor op ijs.
3. Voeg 10,0 µL van elk monster toe aan een nieuwe 0,2 mL-PCR-buis of well van een 96-wellsplaat.
4. Wanneer u meerdere monsters doet, bereid dan een vers mengsel van 0,15 M MgCl<sub>2</sub> Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 en SURVEYOR Nuclease W (SURVEYOR Nucleasemengsel).
  - a. Centrifugeer elke reagens vóór gebruik.
  - b. Vortex elk voorzichtig vóór pipettering.
  - c. Voeg voor elke digestie de volgende componenten toe aan een 0,2 mL-PCR (of groter) microcentrifugebuis.
    - 1,0 µL 0,15 M MgCl<sub>2</sub> 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. Centrifugeer het SURVEYOR Nucleasemengsel gedurende 10 s op lage snelheid.
6. Vortex het SURVEYOR Nucleasemengsel gedurende 10 s voorzichtig op laag toerental.
7. Plaats het SURVEYOR Nucleasemengsel op ijs tot het wordt gebruikt.

8. Pipetteer een 5,0 µL-deel van het SURVEYOR Nucleasemengsel bij elke 10,0 µL gehybridiseerd PCR-product.
9. Na het pipetteren de digestie 0,2 mL-PCR-buizen of 96-wellsplaat gedurende 10 s centrifugeren.
10. De monster 0,2 mL-PCR-buizen of 96-wellsplaat gedurende 10 s voorzichtig vortexen.
11. Gedurende **30** min. bij 42 °C incuberen.
12. Voeg 1,0 µL Stop Solution (PN 708030) toe aan elke buis of well en vortex voorzichtig (totaal SURVEYOR Nucleasereactivolume is 16,0 µL).
13. Injecteer 8,0 µL van elke digestie met behulp van gespecificeerde gradiënten. Raadpleeg **Analyse van K-RAS Exon 2 met behulp van SURVEYOR Nuclease** pag. 12.

**N.B.:** Het in Stap 7 bereide SURVEYOR Nucleasemengsel dient onmiddellijk te worden gebruikt daar SURVEYOR Nuclease W na verloop van tijd inactief wordt wanneer het in aanwezigheid van de andere SURVEYOR Nucleasereactiemengselcomponenten is.

### **Workflow-overwegingen**

De set is ontworpen om mutatie-analyse van 100 monsters mogelijk te maken; Figuur 11 toont een 96-wellsplaat-layout met controles en 92 monsters. Er kunnen kleinere monsterbatches worden gedraaid, maar de controles en WAVE DNA Sizing Standard dienen toch elke keer te worden gedraaid. Er zitten voldoende controlematerialen in de set voor alle te gebruiken combinaties van monsterbatchgrootten.

Over het algemeen dient het verwerken van monsters van begin tot einde te worden uitgevoerd volgens de beschrijving in deze handleiding voor de gebruiker. Wanneer het verwerken van een monster vóór voltooiing van alle stappen wordt gestopt, dient het DNA te worden opgeslagen bij -20 °C tot de volgende stap wordt uitgevoerd. Blootstelling van elk bevroren monster aan herhaalde ontdooien-invriezen cycli dient echter te worden vermeden en opslag bij -20 °C van PCR-geamplificeerde DNA- of SURVEYOR Nucleasedigestieproducten gedurende langere perioden (>1 week) dient te worden vermeden.

## **Controleprocedures**

### **Kwaliteitscontrole van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD***

In de set bevinden zich controleplasmide-DNA's om kwaliteitscontroles op specifieke stappen in de assayprocedure te bieden. Voor het amplificatieprotocol (pag. 8) bieden deze controles een middel om zeker te stellen dat het stammengsel correct wordt geprepareerd en amplificatie goed functioneert. Controles zonder template (waar water wordt toegevoegd in de plaats van template-DNA) worden ook aanbevolen voor het controleren op mogelijke verontreiniging van setcomponenten met een DNA-template.

In de SURVEYOR Nucleasedigestiefase, bieden de amplicons van deze 3 Controle Plasmide-DNA's een effectieve controle dat de knipreactiecondities (SURVEYOR Nucleasemengselbereidings- en incubatiecondities) bevredigend waren. In de analysefase, bieden de WAVE Systemsporen van deze SURVEYOR Nuclease-gedigesteerde controle-amplicons een richtsnoer voor waar de codon 12 en 13 mutaties, zelfs op lage niveaus, zullen eluteren (zie Figuur 3 en 4).

Wanneer hetzij de PCR-amplicons of de SURVEYOR Nucleaseknipfragmenten die zijn ontleend aan de controleplasmide-DNA's niet overeenkomen met de resultaten die worden omschreven in de kwaliteitscontrole van PCR-producten (pag. 10) of voorbeelden van resultaten (pag. 13), raadpleeg dan de Gids voor het opsporen en oplossen van problemen in Bijlage A of neem contact op met Transgenomic technische ondersteuning alvorens door te gaan met verdere stappen bij de analyse van patiëntmonsters.

## Het gebruik van K-RAS Controlplasmide-DNA's

De set wordt geleverd met drie controle-DNA's:

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

Deze controle-DNA's zijn plasmiden met inserties. De positieve controles bevatten elk twee plasmiden: een 50:50 mengsel van de Wild-Type Controle en een mutatiekloon die verschilt van het Wild-Type bij een enkel basepaar. De controles worden in afzonderlijke flacons geleverd, elk in een concentratie van 2,5 ng/µL.

Voor PCR-amplificatie benodigde forward- en reverseprimers worden afzonderlijk in de set geleverd. De sequentie van de Wild-Type- en positieve controles worden hieronder getoond.

Forward-primers zijn gemarkeerd in **Groen**. Reverse-primers zijn gemarkeerd in **Rood**. Coderingsregio's zijn gemarkeerd in **Grijs**. De sequentieverschillen in de positieve controles zijn gemarkeerd in **Paars**. Niet-gemarkeerde hoofdletters zijn niet-coderende cDNA-regio's.

### K-RAS Control: Wild Type Exon 2

MD Loci: 10428 - 10706

Grootte: 286 bp

**cgggtttgtattaaaagggtactgggtggagt**atttgatagtgattaaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat  
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTA**  
**GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATC**  
**CAACAATAGAG**gtaaatctgttttaaatgcatattactggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

### K-RAS Positive Control Codon 12

MD Loci: 10428 - 10706

Grootte: 286 bp

**cgggtttgtattaaaagggtactgggtggagt**atttgatagtgattaaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat  
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT****[G/A]****GTGGCG**  
**TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT**  
**CCAACAATAGAG**gtaaatctgttttaaatgcatattactggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

### K-RAS Positive Control Codon 13

MD Loci: 10428 - 10706

Grootte: 286 bp

**cgggtttgtattaaaagggtactgggtggagt**atttgatagtgattaaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat  
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTG****[G/A]****CG**  
**TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT**  
**CCAACAATAGAG**gtaaatctgttttaaatgcatattactggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

Volg de instructies in het Amplificatieprotocol (pag. 8), SURVEYOR Nucleasedigestie (pag. 10) en analyse van K-RAS Exon 2 met behulp van SURVEYOR Nuclease (pag. 12) voor gebruik van deze controles.

**WIJ ADVISEREN PERSONEN DIE DIT VOOR HET EERST GEBRUIKEN MET KLEM  
ALLEEN TE EXPERIMENTEREN MET DE CONTROLES ALVORENS GENOMISCHE  
MONSTERS TE TESTEN**

## Interpretatie van de resultaten

### Analyse VAN K-RAS Exon 2 met behulp van SURVEYOR Nuclease

Voor snelle en gemakkelijke instelling kan de K-RAS Exon 2 CE protocoltemplate voor het WAVE HS System worden gedownload in Navigatorsoftware. Ga naar

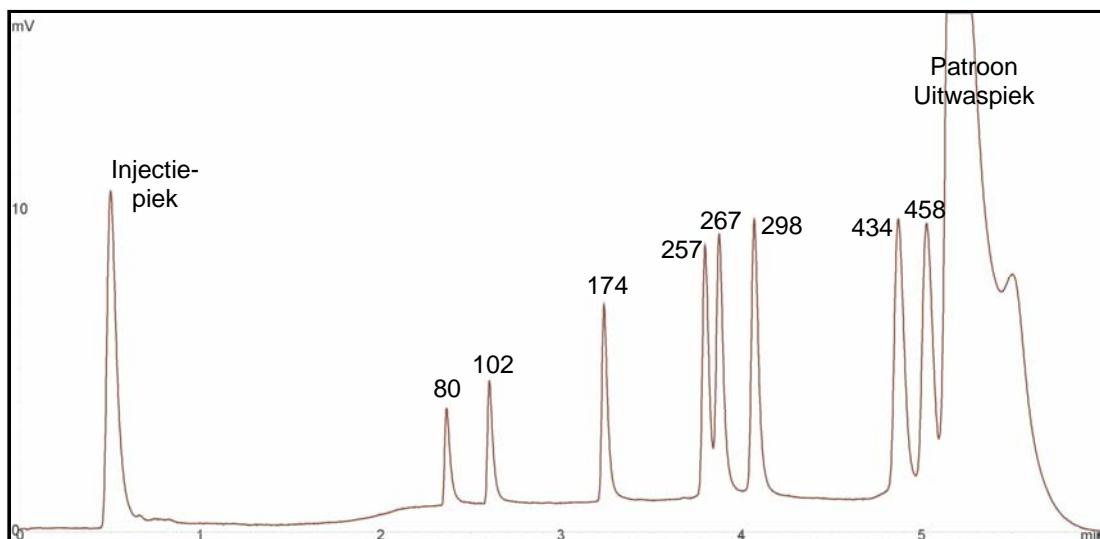
<http://www.transgenomic.com/sp/sw/nav/K-RAS%20Protocol/K-RAS%20ProtocolCEIVD.asp>

en volg de instructies voor installatie van de K-RAS-protocol- en verificatieprocedures.

1. Voor een handmatige instelling van het WAVE HS System, zie de parameters voor gradiëntpredictie in **Bijlage B: WAVE HS Systemparameters voor K-RAS-protocol**.

**N.B.:** wij adviseren het geïnstalleerde protocol te gebruiken in plaats van handmatige instelling.

2. Let op, voer voor vergelijkings-/controledoelinden altijd SURVEYOR Nucleasedigestie uit op beide controles (wild-type- en positieve controles) en de monster-DNA's en draai in hetzelfde WAVE Systemplateau.
3. Daarnaast kan de Transgenomic Sizing Standard (PN 560078) voorafgaand aan de monsteranalyse worden gedraaid om zeker te stellen dat het WAVE System goed werkt. Men dient een blanco-run (0  $\mu$ L injectie) te draaien met behulp van de K-RAS Exon 2 Gradiënt. Daarna dient 8  $\mu$ L van de WAVE DNA Sizing Standard te worden geïnjecteerd op de K-RAS Exon 2 Gradiënt – zie **Figuur 2** voor verwachte resultaten.

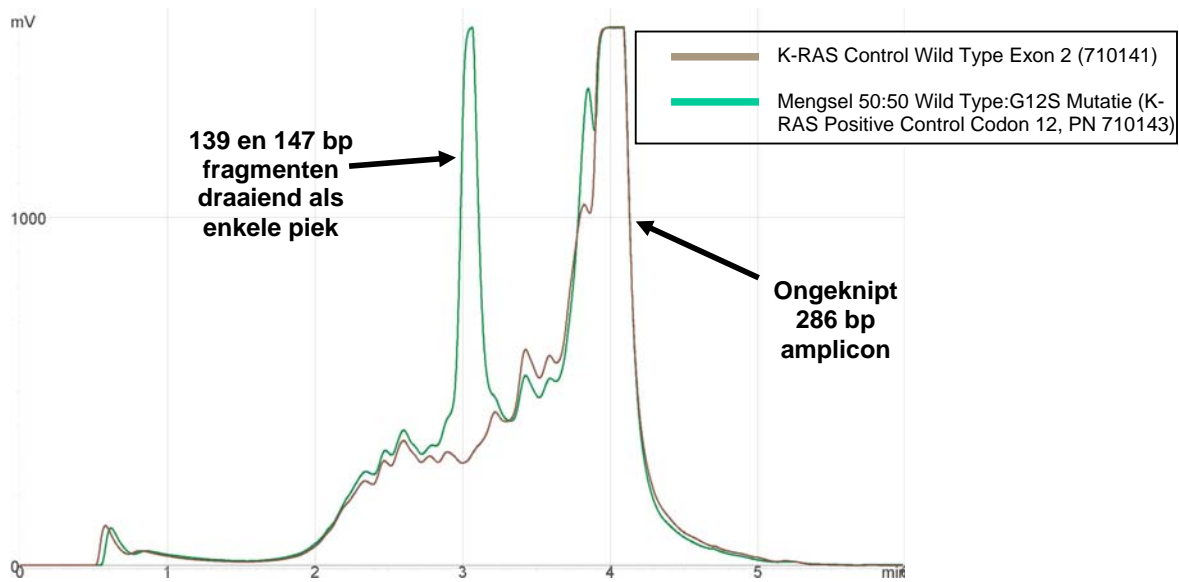


**Figuur 2** WAVE DNA Sizing Standard injectie met behulp van K-RAS Exon 2 gradiënt (UV-detectie). Grootten van fragmenten worden aangegeven in base-paren.

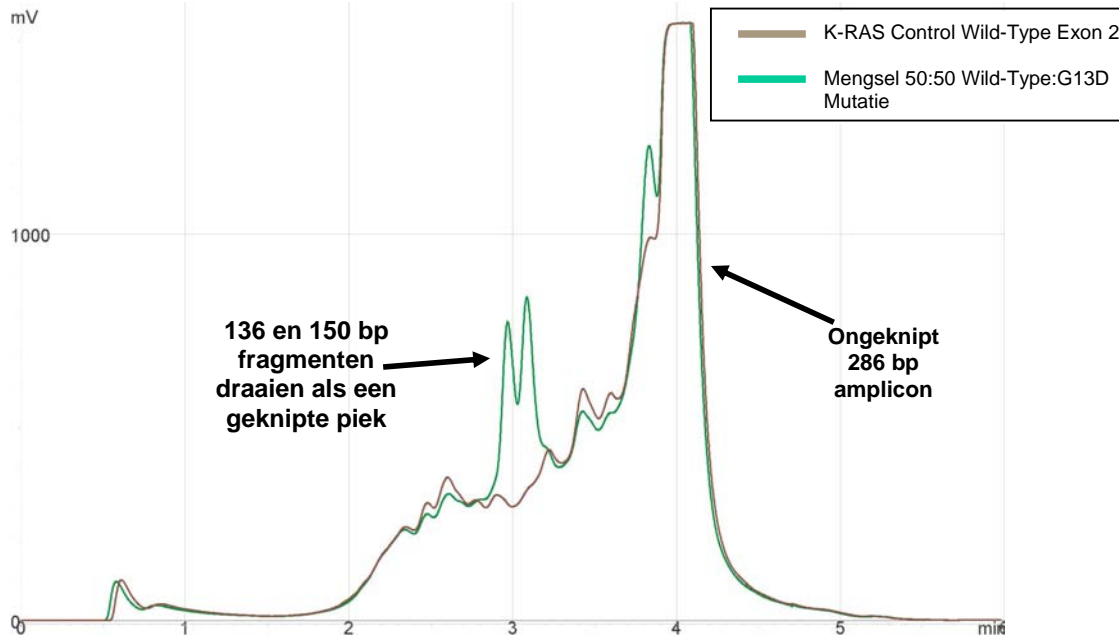
Voor bijzonderheden van gradiënt voor K-RAS Exon 2, raadpleeg **Bijlage B – Gradiënt voor K-RAS Exon 2**.

### Voorbeelden van resultaten

Voorbeelden van resultaten die zijn verkregen met behulp van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* voor WAVE HS Systems worden getoond in Figuur 3 en 4 hieronder. In deze voorbeelden werd het in het deel Overzicht omschreven proces exact gevolgd.



**Figuur 3 toont SURVEYOR Nucleatedigestieproducten van het 286 bp Exon 2 codon 12 ampliconheteroduplexeneluit als een enkele piek.** De in deze PCR gebruikte templates waren de K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 en K-RAS Positive Control Codon 12. Deze G12S mutatie produceert G-T en C-A heteroduplexen die 139 & 147 bp fragmenten produceren na SURVEYOR Nucleatedigestie; deze pieken van fragmenten worden niet opgelost bij deze gradiënt en draaien als een enkele piek. Digestieproducten werden geanalyseerd op een WAVE HS System.



**Figuur 4 toont SURVEYOR Nucleatedigestieproducten van het 286 bp Exon 2 codon 13 mutatie-ampliconheteroduplexeneluit als een dubbele piek.** De in deze PCR gebruikte templates waren de K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 en K-RAS Positive Control Codon 13. Deze G13D-mutatie produceert G-T en C-A heteroduplexen die 136 & 150 bp fragmenten produceren na SURVEYOR Nucleatedigestie; deze pieken van fragmenten scheiden om een karakteristieke dubbele piek te produceren. Digestieproducten werden geanalyseerd op een WAVE HS System.

Deze set is ontworpen om een distinctief WAVE-diagram voor codon 12 en 13 mutaties duidelijk aan te tonen; dit biedt de gebruiker de optie van interne validatie van het vermogen de mutatiestatus van een monster te deduceren zonder de noodzaak voor sequentiebevestiging.

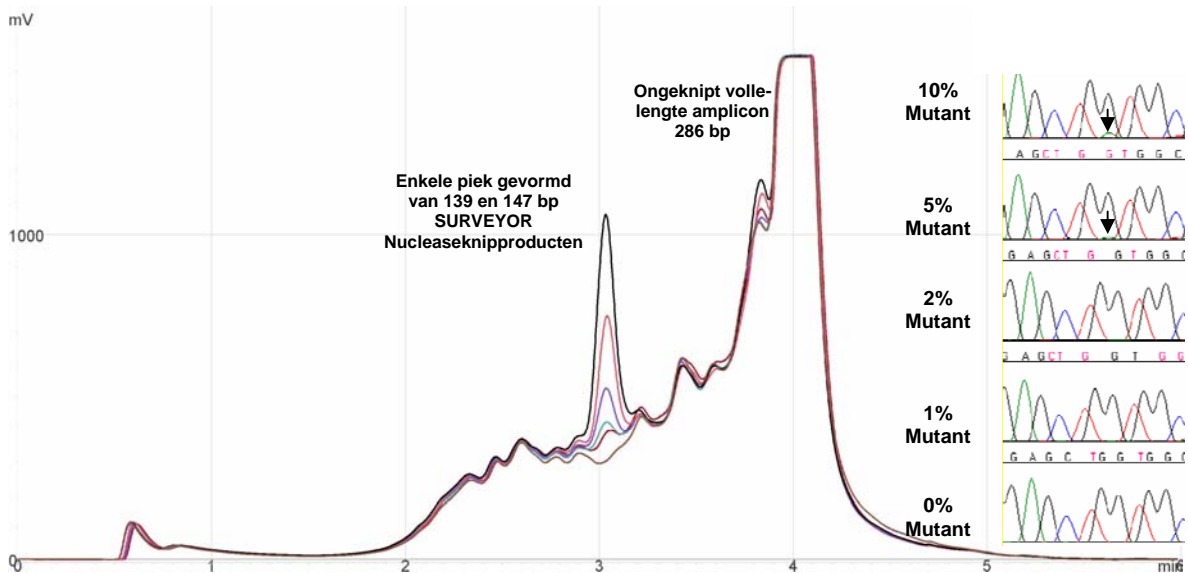
## Prestatiekenmerken

### Detectieniveau van SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD*

Validatie van de SURVEYOR Scan *K-RAS* Mutation Detection Kit *CE IVD* met behulp van plasmideklonen van alle gemeenschappelijke *K-RAS* Exon 2 mutaties heeft aangetoond dat SURVEYOR Nucleasepieken kunnen worden gedetecteerd in een mengsel van 1% mutant op 99% wild-type.

De onderstaande resultaten tonen de WAVE HS Systemdiagrammen van dilutieseries voor voorbeeldmutaties in elk van codons 12 en 13 en de sequentiërings-elektroferogrammen van geselecteerde diluties.

### K-RAS Exon 2 G12S Mutatieniveau van Detectiedilutieseries



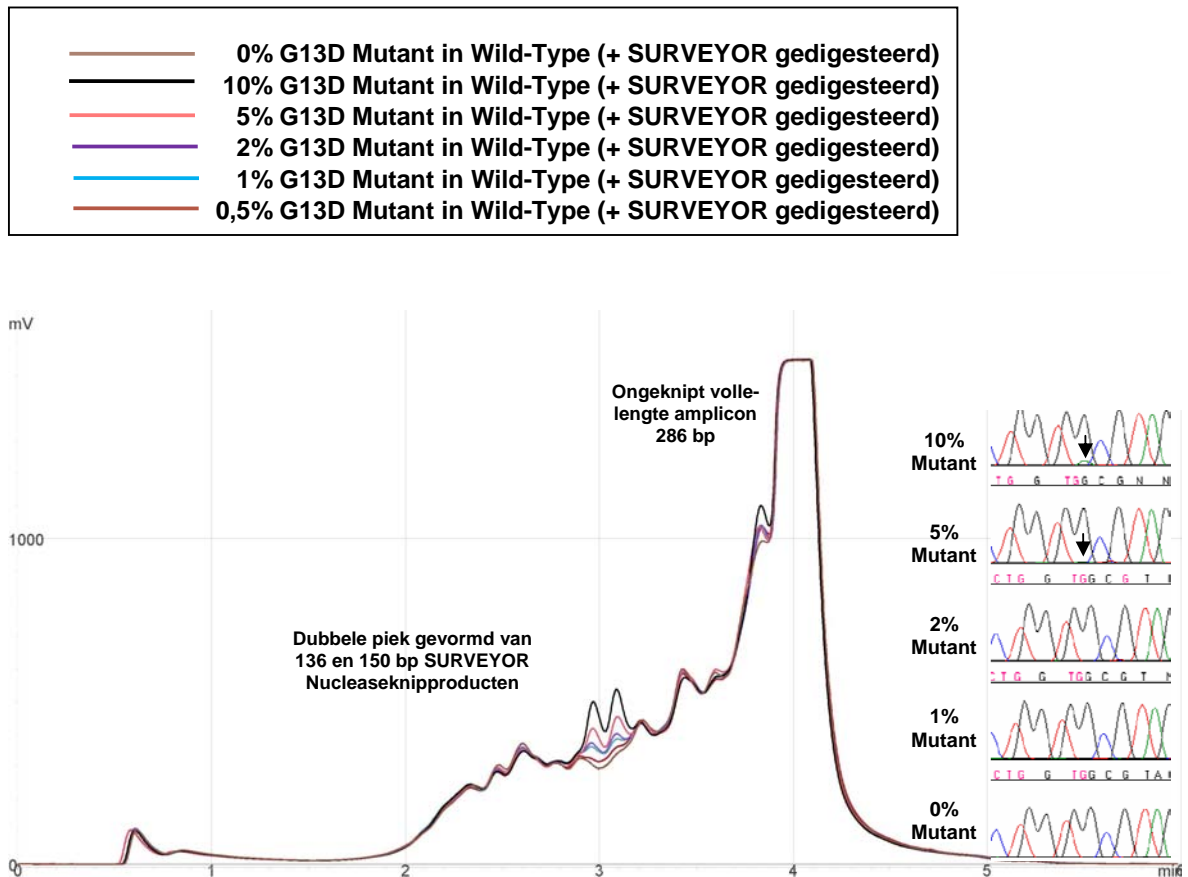
**Figuur 5 SURVEYOR Scan *K-RAS* Mutation Detection Kit *CE IVD* Titratie van de *K-RAS* Exon 2 G12S mutatie**

Er werden verschillende mutantniveaus bereid door het mengen van *K-RAS* Control: Wild-Type Exon 2 (PN 710141) en *K-RAS* Positive Control Codon 12 (PN 710143), vervolgens het verhitten en afkoelen van het mengsel om heteroduplexen te vormen. **LET OP:** voor het bereiken van een 90% Wild-type, 10% Mutant wordt een mengsel van 80% PN 710141 en 20% PN 710143 (zie pag. 11) bereid. Omdat de G12S mutatie zich bij het centrum van het Exon 2 amplicon bevindt, hebben de twee SURVEYOR Nucleaseknipproducten zeer soortgelijke retentietijden en vormen zij een enkele piek. Wij willen er ook op wijzen dat de meerderheid van het ampliconmengsel bestaat uit wild-type-homoduplexen die niet zijn geknipt door SURVEYOR Nuclease. De detectielimiet van het G12S mutantamplicon is 1% met SURVEYOR Scan *K-RAS* Mutation Detection Kit *CE IVD* en het WAVE HS System.

### Limiet van detectie sequentiëringresultaten voor K-RAS Exon 2 G12S Mutatie

Elektroferogrammen tonen de sequentiëringresultaten voor PCR-producten die worden geanalyseerd door SURVEYOR Nuclease. Geautomatiseerde sequentiëringsooproep van zowel forward- als reverse-strengen mist vaak de detectie van de G12S-mutatie in mengsels met wild-type lager dan 10%. Samen met de SURVEYOR Nuclease resultaten is het mogelijk de 5% mutante sequentiëringselektroferogrammen voor codon 12 met meer vertrouwen te interpreteren.

### K-RAS Exon 2 G13D Mutatieniveau van Detectiedilutieseries



**Figuur 6 SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* Titratie van de K-RAS Exon 2 G13DS-mutatie**

Er werden verschillende mutantniveaus bereid door het mengen van K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 (PN 710141) en K-RAS Positive Control Codon 13 (PN 710144), vervolgens het verhitten en afkoelen van het mengsel om heteroduplexen te vormen. Deze mengsels werden vervolgens geknipt met SURVEYOR Nuclease en geanalyseerd op het WAVE 4500 HT HS System. **LET OP:** voor het bereiken van een 90% Wild-type, 10% Mutant wordt een mengsel van 80% PN 710141 en 20% PN 710144 (zie pag. 11) bereid. Omdat de G13D-mutatie zich iets verder van het centrum van het Exon 2 amplicon bevindt dan de G12S-mutatie (zie Figuur 5), hebben de twee SURVEYOR Nucleaseknipproducten verschillende retentietijden en vormen een dubbele piek. Wij willen er op wijzen dat het meeste van het ampliconmengsel bestaat uit wild-type-homoduplexen die niet zijn geknipt door SURVEYOR Nuclease. De detectielimiet van het G13D mutantamplicon is 1% met SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* en het WAVE HS System.

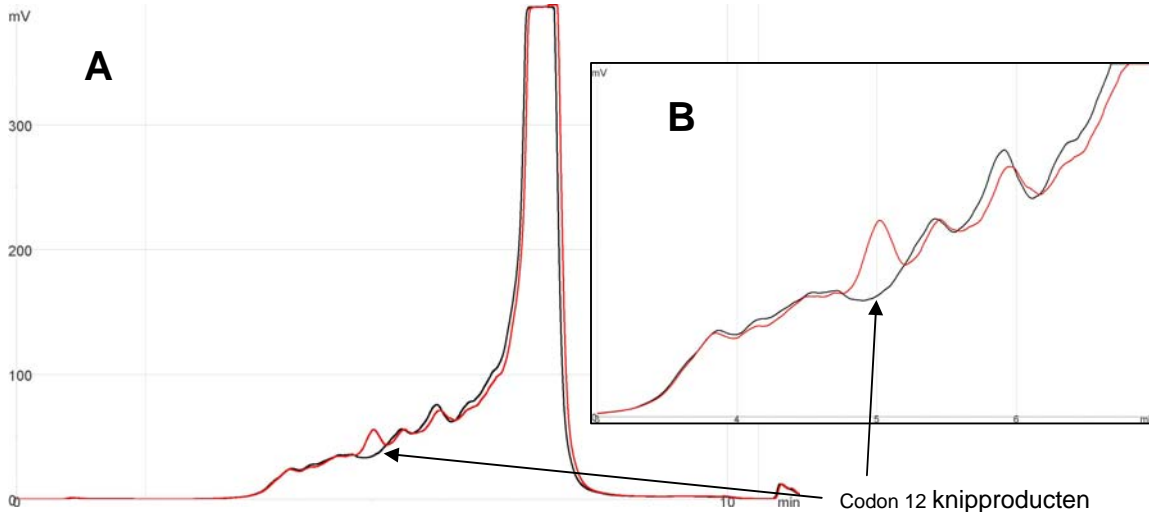
### Limiet van detectiesequentiëringresultaten voor K-RAS Exon 2 G13D Mutatie

Ter vergelijking worden elektroferogrammen die de sequentiëringresultaten tonen voor PCR-producten op de verschillende mutantniveaus getoond. Geautomatiseerde sequentiëringsooproep van zowel forward- als reverse-strengen mist vaak de detectie van de G13D-mutatie in mengsels met wild-type lager dan 10%. Samen met de SURVEYOR Nucleaseresultaten is het mogelijk met meer betrouwbaarheid de 90:10 wild-type:mutant (5% mutatie) sequentiërende elektroferogrammen te interpreteren voor codon 13 als een mutatie bevattend.

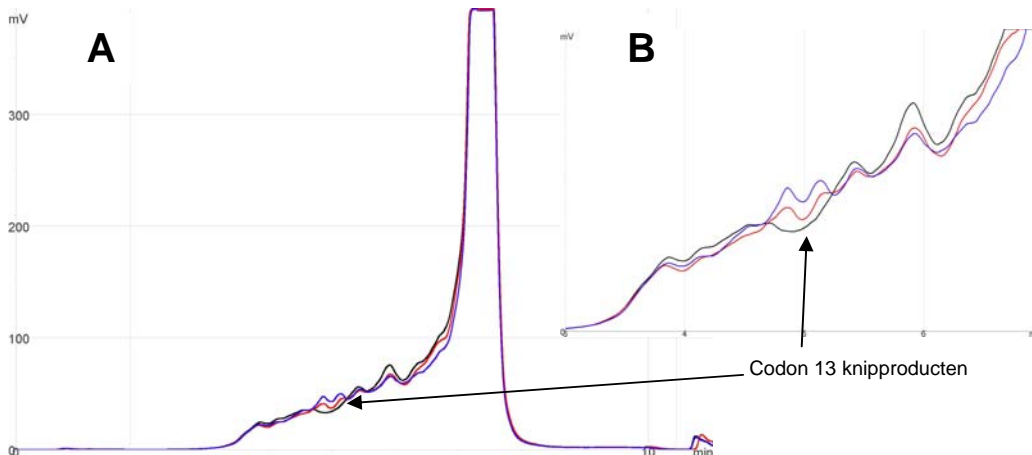
### Interpretatie van mutatiemonsters met een laag percentage

Hoewel de interne en externe validatie-onderzoeken van de SURVEYOR Scan K-RAS Kit hebben aangetoond dat detectie van mutaties bij 1% van wild-type realistisch is, is dit afhankelijk van de kwaliteit van een gegeven basislijn van een diagram. Genomische DNA- of PCR-reacties van slechte kwaliteit, inadequate DNASep Cartridge wasprocedures (zie Wasprocedure pag. 31) of een sub-optimale WAVE Systeminstelling kunnen allemaal resulteren in een meer onregelmatige basislijn en maken discriminatie van kleine pieken over basislijn meer uitdagend.

De onderstaande diagrammen (Figuur 7 en 8) tonen de geëxpandeerde regio's van diagrammen met laag-niveaumutaties en negatieve controlebasislijnen.



**Figuur 7 Laagniveaudetectie van Codon 12-mutatie.** Rode lijn = monster met laag-niveau codon 12-mutatie. Zwarte lijn is wild-type controle. Figuur 7B is een vergrote regio van de regio die de SURVEYOR Nucleaseknipproducten toont. Wij willen erop wijzen dat de basislijnruis met soortgelijke amplitudepieken als de knipfragmentpieken overeenkomt tussen de test- en controlediagrammen.



**Figuur 8 Laagniveaudetectie van Codon 13-mutatie.** Rode en blauwe lijn = monsters met laag-niveau codon 13-mutaties. Zwarte lijn is wild-type controle. Figuur 8B is een vergrote regio van de

regio die de SURVEYOR Nucleaseknipproducten toont. Wij willen erop wijzen dat de basislijnruis met soortgelijke amplitudepieken als de knipfragmentpieken overeenkomt tussen de test- en controlediagrammen.

Wij zouden adviseren dat onder de omstandigheden dat er enige twijfel bestaat over de aanwezigheid of het ontbreken van SURVEYOR Nucleasedigestiepieken, de monsteranalyse dient te worden herhaald met behulp van hetzelfde monster genomisch DNA-template. Wanneer de aanwezigheid van pieken nog steeds betwijfeld wordt of onduidelijk is, dient het genomisch DNA opnieuw geïsoleerd en geanalyseerd te worden. Aanbevelingen voor het versterken van signaal ten opzichte van ruisratio's omvatten:

- Selecteren van FFPE-plaatjes waarop zich een hoge concentratie van tumorcellen bevindt.
- Micro-ontleding om de tumorproportie te verhogen ten opzichte van normale cellen.
- Controleren of het genomisch DNA voldoet aan de zuiverheidscriteria die worden omschreven in **Template-overwegingen** op pag. 7.

Laag-percentage mutatiebelastingen zullen even moeilijk te bevestigen zijn door middel van DNA-sequentiëring.

## Beperkingen van de assayprocedure

Verontreinigende stoffen die worden overgedragen van extractie van formaline-gefixeerde paraffine-ingebedde monsters kunnen interfereren met de PCR-amplificatie en SURVEYOR Nucleasedigestieprocedures. De in Kwaliteitscontrole van PCR-producten p10 beschreven kwaliteitscontroleprocedures zullen garanderen dat het geëxtraheerde DNA geschikt is voor gebruik in deze set.

Deze set is gevalideerd voor gebruik met formaline-gefixeerde paraffine-ingebedde colorectale kankertumorbiopsiemonsters. Hij is niet gevalideerd voor gebruik hetzij met andere kankertypes of met verse of bevroren biopsiemonsters.

Voor het opsporen en oplossen van niet-standaardresultaten en bijzonderheden van factoren die van invloed kunnen zijn op deze analyse, zie de onderstaande Gids voor het opsporen en oplossen van problemen in Bijlage A.

Men dient voorzichtig te zijn om overdracht en kruisverontreiniging met deze set te vermijden. De extreme gevoeligheid van de analysemethode vereist het nemen van voorzorgen op de volgende punten:

- Zorg ervoor dat alle monsters zodanig worden gehanteerd dat geen kruisverontreiniging tussen monsters kan ontstaan
- Zorg ervoor dat de plasmidecontroles van de set in alle fasen van de analyse afzonderlijk van testmonsters worden gehanteerd
- Zorg ervoor dat monsterpipettering in 96-wellsplaten geen monsterverontreiniging van aangrenzende wells toelaat als gevolg van spetteren tijdens het mengen of door het niet veranderen van pipettips.

## Literatuurreferenties

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. niet-gepubliceerde waarnemingen (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.** Mitsushashi 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).

## Bijlage A

### Gids voor het opsporen en oplossen van problemen

Het effectieve gebruik van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* is afhankelijk van de succesvolle voltooiing van een aantal stappen. Een van meest kritieke is PCR-amplificatie die moet resulteren in de productie van specifieke DNA's van uniforme grootte in voldoende hoeveelheid die kunnen worden gedetecteerd na hybridisatie en knippen. Dit is op zijn beurt afhankelijk van de kwaliteit van het initiële monster. Uitvoering van de analyse met DNA dat niet voldoet aan de kwaliteits- en kwantiteitscriteria wordt afgeraden.

**N.B.:** Als u de SURVEYOR Nuclease voor het eerst gebruikt, voer dan de experimenten in het deel **Het gebruik van K-RAS Controlplasmide DNA's** (pag. 11) uit na het lezen en begrijpen van het deel Stap-voor-Stap Instructies (pag. 7). Zorg dat u de resultaten van de K-RAS Controlplasmide DNA's hebt alvorens contact op te nemen met Transgenomic Technical Support.

Deze Gids voor het opsporen en oplossen van problemen dekt een lijst met kwesties die u zou kunnen tegenkomen bij het gebruik van de SURVEYOR Scan *K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD* en suggesties over hoe ze kunnen worden opgelost.

#### Probleem 1 – Lage PCR-opbrengst of geen PCR-product

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Slechte kwaliteit van DNA-template	Herhaal zuivering van DNA; beoordeel gebruikte zuiveringsmethode.
Thermocycler niet gekalibreerd	Controleer kalibratie van thermocycler.
Niet voldoende template	Verhoog de hoeveelheid template.

**N.B.:** Men dient kwaliteits-DNA van FFPE te gebruiken. Het DNA dient een concentratie te hebben van 25 ng/μL als bepaald door middel van absorptie op 260 nm, een absorptieratio op 260/280 nm van >1,8 te hebben en >90% DNA te zijn (d.w.z. vrij van de meeste tRNA- en rRNA-verontreiniging als beoordeeld door middel van verschijning op een agarosegel). Sla DNA-monsters op bij -20 °C.

Voor analyse van DNA-template geëxtraheerd uit paraffine-ingebed weefsel dient een aantal voorzorgsmaatregelen te worden getroffen. Het geëxtraheerde DNA kan worden behandeld met uracil-DNA-glycosylase om amplificatie van DNA-fragmenten die gedeamineerde C-residuen bevatten te voorkomen. Vaak wordt een hoog percentage van het A<sub>260</sub> adsorberende materiaal dat wordt geëxtraheerd uit in paraffine ingebed weefsel niet goed geamplificeerd tijdens PCR. Het gebruik van een grotere hoeveelheid start-DNA zal vaak helpen bij het produceren van een geschikt amplificatieproduct.

#### Probleem 2 – Meerdere PCR-producten

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING.
Uitgloeitemperatuur te laag	Controleer kalibratie van thermocycler.

**N.B.:** PCR dient een voldoende hoge opbrengst (>20 ng/μL) van een **ENKELE** geamplificeerde species van het juiste formaat te produceren. **De met deze set geleverde DNA Polymerase en de DNA Polymerase 10X PCR Buffer moet worden gebruikt voor PCR.** Amplicons uit controles dienen te worden gedigesteerd met SURVEYOR Nuclease en te draaien om valse achtergrondruis uit te sluiten door middel van visuele vergelijking van chromatogramprofielen (zie **Voorbeelden van resultaten** pag. 13, Figuren 3-4). Onderzoek elk versterkt DNA-product voorafgaand aan digestie door middel van gelelektroforese of WAVE HPLC om zeker te zijn dat het een enkele species van de verwachte grootte is.

### Probleem 3 – Geen knipproducten opgemerkt bij analyse na SURVEYOR Nuclease behandeling van heteroduplexen

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Proportie van mismatchtarget te laag	Controleer assay met behulp van Controles.
Inefficiënte vorming van heteroduplexen	Volg correcte hybridisatieprocedure. Gebruik vers gehybridiseerd DNA in SURVEYOR Nucleasedigesten.
Inactieve SURVEYOR Nuclease	Voer de Controlereactie uit om de enzymprestatie te verifiëren.

**N.B.:** SURVEYOR Nuclease knipt voornamelijk bij mismatches in heteroduplexen. De proportie van heteroduplex tot homoduplex in het gehybridiseerde monster zal het SURVEYOR Nuclease digestiesignaal bepalen. Wanneer de K-RAS-mutatie in een zeer lage concentratie aanwezig is in het genomische DNA-monster kan het signaal te laag zijn om een positief resultaat te geven.

Het is belangrijk zeker te stellen dat de hybridisatiestap is opgenomen in het thermocyclerprogramma (zie **Amplificatieprotocol** pag. 9) om de efficiëntie van de vorming van heteroduplex te maximaliseren. Heteroduplexen worden zeer inefficiënt gevormd tijdens standaard PCR-reacties.

**N.B.:** de signaal ten opzichte van ruis ratio is over het algemeen hoog genoeg om mutaties te detecteren die in een laag percentage van de totale DNA-template aanwezig zijn; het is mogelijk 1% tot 2% mutante DNA te detecteren. Figuur 5 en 6 (pag. 15-16) tonen detectie van K-RAS Exon 2 Codon 12 en 13 mutaties aanwezig (2-18% heteroduplex) met een WAVE HS System. Figuur 3-4 (pag. 13-14) tonen de digestieproducten die worden gegenereerd met homoduplex en heteroduplex K-RAS Positive Control DNAs (bijgesloten in deze set) op een WAVE HS System. De mutatie-specifieke knipproducten worden duidelijk gezien als twee nieuwe pieken die eluteren met de verwachte grootten die kunnen worden geraamd in relatie tot de DNA-groottemarker.

**Let op:** commercieel beschikbare PCR Buffers variëren dramatisch in inhoud en de formuleringen zijn vaak niet gedefinieerd door leveranciers. Een aantal buffers zijn **NIET** compatibel met SURVEYOR Nuclease als gevolg van pH of de aanwezigheid van additieven, surfactanten of andere eigen ingrediënten. **Gebruik GEEN andere polymerase of 10X polymerasebuffers dan de in de set meegeleverde.**

### Probleem 4 – Hoge achtergrond na SURVEYOR Nucleasebehandeling

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Suboptimale hybridisatiestap bereik	Doe het volgende: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Controleer of de DNA-concentratie binnen het bereik van &gt;25 ng/μL valt.</li> <li>2. Herhaal de hybridisatiestap, vergeet niet de hybridisatieprocedure te volgen.</li> </ol>
Hoeveelheid DNA te laag	Controleer opbrengst en kwaliteit van template-DNA
Niet-specifieke PCR-producten	Controleer opbrengst en kwaliteit van template-DNA.
SURVEYOR Enhancer W2 en/of SURVEYOR Enhancer Cofactor hebben activiteit verloren	Controleer de uiterste gebruiksdatum van de set.

**N.B.:** SURVEYOR Nuclease snijdt dubbelstrengs-DNA soms in op willekeurig overeenkomende locaties, die achtergrond produceren na digestie<sup>18</sup>. Deze activiteit wordt onderdrukt door middel van SURVEYOR Enhancer W2 en zijn cofactor zonder anders de mismatchknipreactie negatief te beïnvloeden. SURVEYOR Enhancer W2 en SURVEYOR Enhancer Cofactor zijn bijgesloten in deze set en dienen altijd te worden gebruikt.

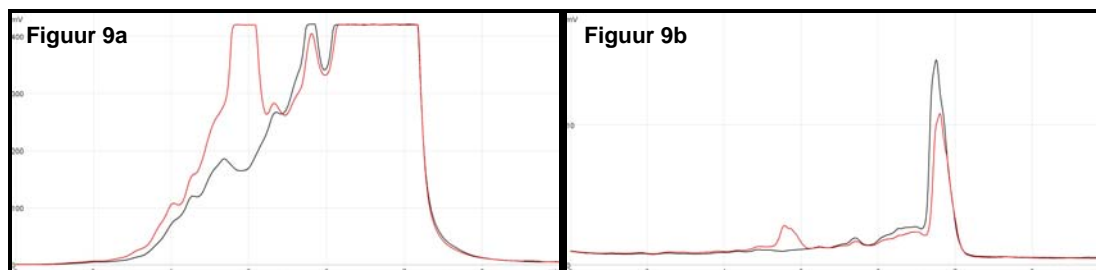
Wanneer dit insnijden gebeurt, zal het genereren van kleine pieken, vergelijken van controledigesten van homoduplexen met monsterdigesten deze toestaan te worden herkend en genormaliseerd met Navigator Software.

### Probleem 5 – SURVEYOR Nucleasedigestiepieken in negatieve controles

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Verontreiniging van inhoud van set met K-RAS amplicons of plasmidecontroles.	<b>Gooi alle setcomponenten weg en gebruik een verse set.</b> Neem contact op met Transgenomic Technical Support om mogelijke oorzaken en bronnen van verontreiniging te bespreken.

### Probleem 6 – Toppen van SURVEYOR Nucleasedigestiepieken afgevlakt op WAVE HSD fluorescentiediagram

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
De zeer gevoelige detector heeft een intern feedbackalgoritme dat de hoeveelheid licht monitort die door de stromingscel gaat. Hoe meer licht de stromingscel ingaat, hoe lager de detectorafbrekwaarde (mV) maar hoe hoger de gevoeligheid.	Dit probleem zou worden opgelost door het veranderen van de emissiegolflengte ten koste van het verlies van gevoeligheid.  Wij adviseren verwijzing naar het UV-detector chromatografische diagram. Wanneer de fluorescerende detectorpieken worden afgeknot in het chromatogram, dan zal het UV-diagram u een duidelijk leesbaar signaal geven. <b>Zie voorbeelden in onderstaande Figuren 9a en 9b.</b>  <b>Als alternatief kan een kleiner volume monster opnieuw worden geïnjecteerd en zou de fluorescentiesignaalintensiteit moeten afnemen.</b>



**Figuur 9a en 9b. Bij het vinden van afgeknotte pieken met behulp van de HSD Fluorescent Detector, kan de UV Detector output ook worden gebruikt voor monsteranalyse**

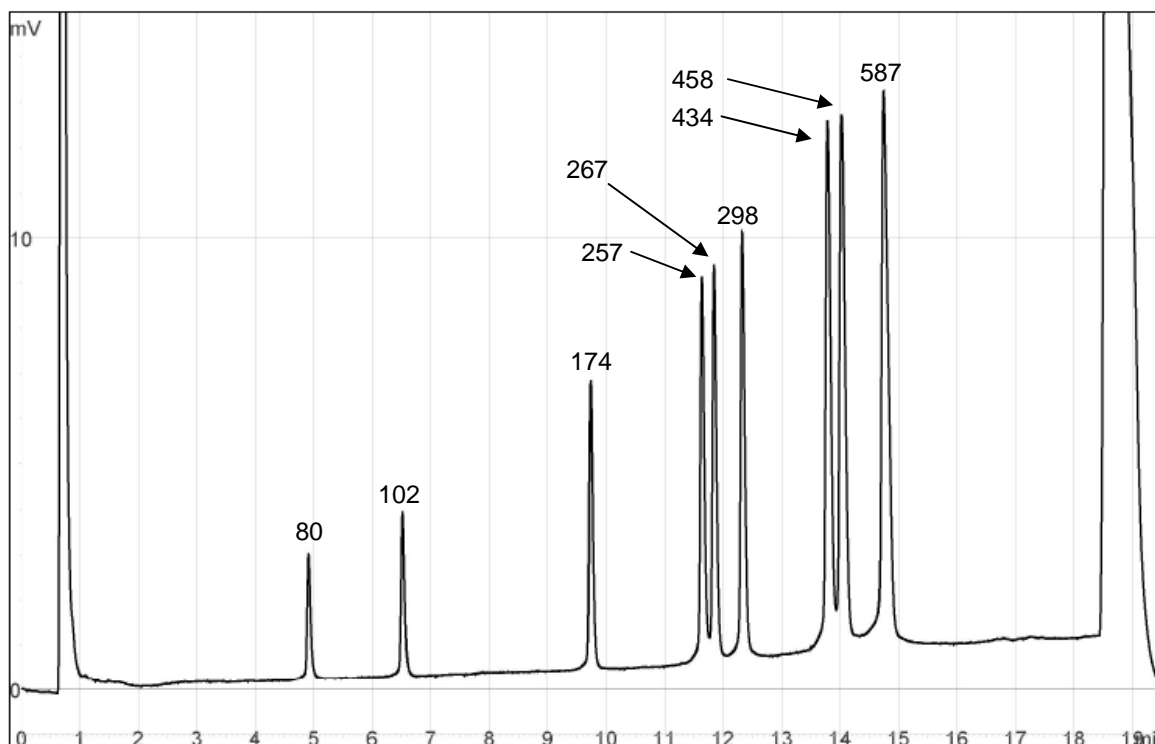
De bovengenoemde diagrammen tonen dezelfde output van genomische DNA-monsters van zowel de Fluorescent- (9a) als de UV (9b) Detectors. In elke figuur is de rode lijn een G12V-mutatiemonster; de zwarte lijn is een wild-type referentiemonster. De grote hoeveelheid van DNA geladen en geanalyseerd met behulp van de fluorescentiedetectoroutput in Figuur 9a leidt tot afgeknotte pieken voor zowel de homoduplex- als de SURVEYOR Nucleasedigestiepieken. Het overeenkomende UV-detectordiagram toont zowel de SURVEYOR Nucleasedigestiepieken als de onafgesneden homoduplexpieken duidelijk.

## Bijlage B:

### **WAVE System INITIAL Setup/Cartridgekalibratie (Navigator Software) voor SURVEYOR Nucleasetoepassingen**

1. Gebruik alleen WAVE Optimized Buffers.
2. Spoel de bufferlijnen met Buffer A, B en D.
3. Spoel de injectiespuit voor (3500: gebruik het instrumentenpaneel van de autosampler; 4500: gebruik de software).
4. Spoel de HSX pomp voor.
5. Selecteer Module Setup onder Setup op de arolmenubalk.
6. Markeer de UV detector in het instrumentenvenster.
7. Verifieer dat de detectorgolflengte is ingesteld op 260 nm.
8. Markeer de fluorescence detector in het instrumentenvenster.
9. Verifieer dat de detectorexcitatiegolflengte is ingesteld op 492 nm en de emissiegolflengte is ingesteld op 526 nm (HS Staining Solution I).
10. Creëer een nieuw project (indien nodig) of open het bestaande project met behulp van het Navigator Software arolmenu.
11. Wanneer een nieuw project werd gecreëerd dient een nieuw monsterplateau te worden gecreëerd (let op dat het correcte plateau type wordt geselecteerd).
12. Creëer twee blanco injecties met behulp van het universal lineair application type.
  - a. Klik links op de speed plate op flacon 96 om de flacon te markeren (ervan uitgaand dat het 96-well tray type wordt gebruikt).
  - b. Klik rechts met de muis op de flacon om de injection page te openen.
  - c. Verander het application type in universal linear.
  - d. Verander de reinigingsoptie in fast clean (indien van toepassing) of active clean.
  - e. Verifieer of de oventemperatuur 50,0 °C is in de methode.
  - f. Verander het volume in 0 µL.
  - g. Verander het aantal injecties in 2.
  - h. Klik links op de [Generate] toets links onderin.
13. Laat injecties draaien.
14. Creëer drie 5 µl injecties van WAVE DNA Sizing Standard (Transgenomic onderdeel # 560078) met behulp van het universele lineaire toepassingstype.
  - a. Plaats een monster van de WAVE DNA Sizing Standard in een 0,2 mL-PCR-buis in positie 96.
  - b. Klik links op de snelheidsplaat op flacon 96 om de flacon te markeren (ervan uitgaand dat het 96-well tray type wordt gebruikt).
  - c. Klik rechts met de muis op de flacon om de injection page te openen.
  - d. Verander het applicatiin type in universal linear.
  - e. Verander de cleaning option in fast clean (indien van toepassing) of active clean.
  - f. Verifieer of de oventemperatuur 50,0 °C is in de methode.
  - g. Verander het volume in 5 µL.
  - h. Verander het aantal injecties in 3.
  - i. Klik links op de [Generate] toets links onderin.

15. Laat injecties draaien.
16. Bekijk zodra de runs zijn voltooid de chromatogrammen om retentietijdstabiliteit van de 80- en 587-bp pieken zeker te stellen.
  - a. De retentietijd van de 80-bp piek en de 587-bp piek van de WAVE DNA Sizing Standard dient van run tot run binnen 0,1 min. te zijn.
17. Voer patroonkalibratie uit alvorens werkelijke monsters te draaien.
  - a. Klik op de toets [Select Results] onder de Analysis tab.
  - b. Zoek de derde injectie van de WAVE DNA Sizing Standard. Open het project en plateau met behulp van de bestandsnavigatie aan de linkerkant en gebruik vervolgens de injection display aan de rechterkant om de injectie te zoeken.
  - c. Markeer de derde WAVE DNA Sizing Standard injectie en klik vervolgens op de toets [Add Selected Results].
  - d. Klik rechts op het chromatogram.
  - e. Selecteer [Chart].
  - f. Selecteer onder de Peak Labels Option, het Peak Labels Box en gebruik het afrolmenu om [Peak Retention Time] te selecteren.
  - g. Klik op [Apply].
  - h. Klik op [OK].
  - i. Gebruik met behulp van de menubalk het Setup afrolmenu en selecteer [Cartridge Calibration].
  - j. Voer de retentietijdwaarden in die worden weergegeven op het chromatogram voor de overeenkomende piek van de WAVE DNA Sizing Standard.
  - k. Selecteer [Plot New Calibration].
  - l. Selecteer [Accept New Calibration].



**Figuur 10.** Typische WAVE DNA Sizing Standard analyse met behulp van de Universal Linear Method Type van Navigator Software (WAVE 4500 HT HS voorbeeld).

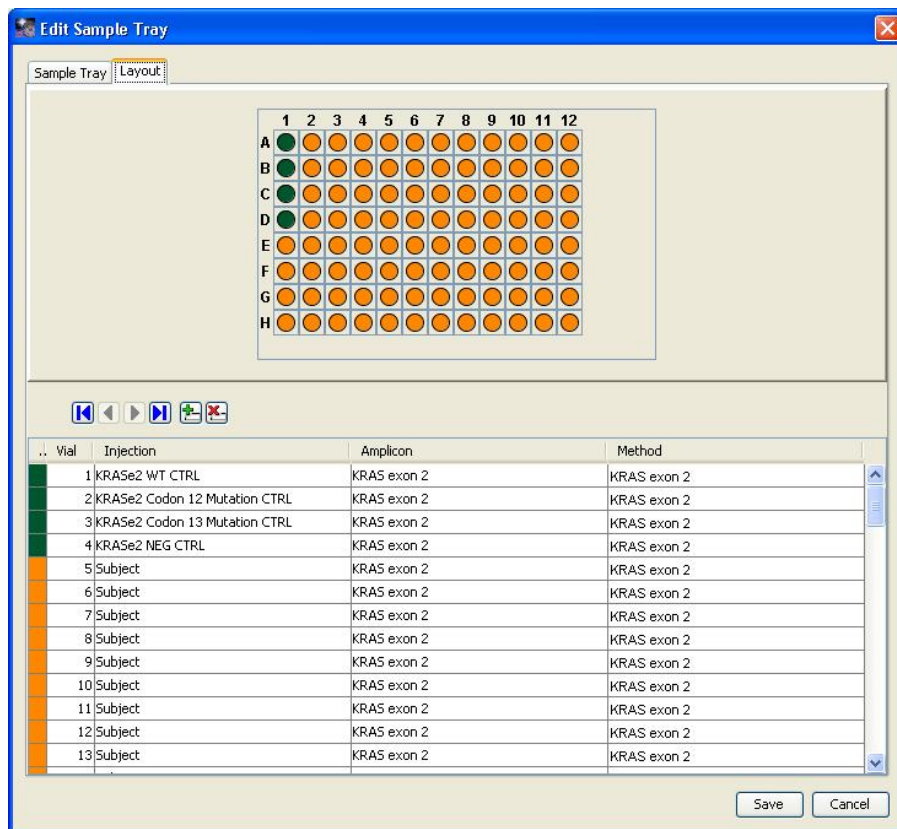
## WAVE HS System parameters voor K-RAS-protocol

Wij adviseren downloaden van de K-RAS Exon 2 CE Protocoltemplate voor installatie in Navigator Software. Raadpleeg de K-RAS Installatiegids op:

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

Raadpleeg, voor handmatige instelling van het WAVE HS System, of om te controleren op correcte installatie van de K-RAS Exon 2 CE Protocoltemplate, de volgende parameters voor gradiëntpredictie:

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



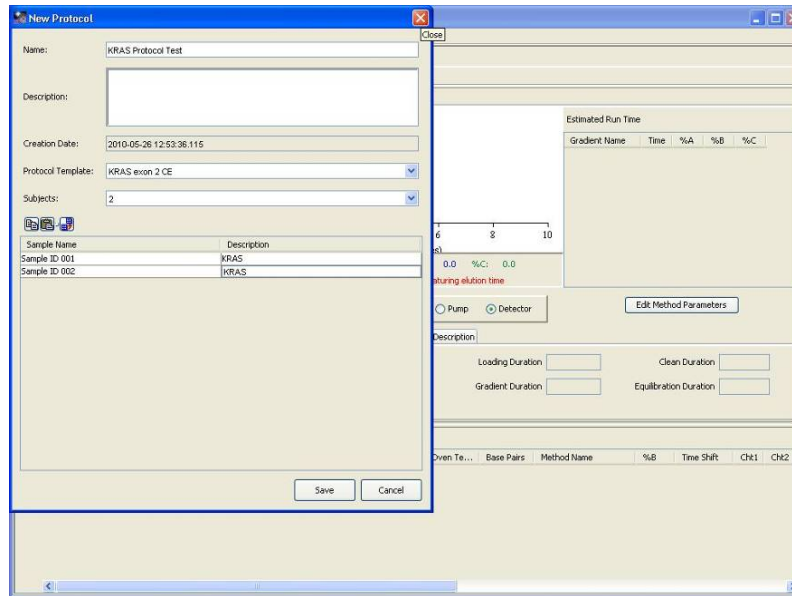
**Figuur 11** Screen-shot Plaatinstelling; 92 monsters en controles

De K-RAS Exon 2 CE Protocol Template vult de injectietabel zoals hierboven getoond. In totaal kunnen 92 Exon 2-monsters (oranje wells) worden geanalyseerd op een enkele plaat. Daarnaast worden voor elke plaat drie controles voor Exon 2 (groene wells) en een negatieve controle uitgevoerd.

Let op dat de injectietabel is opgezet in de kolomvorm.

- De K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 wordt geplaatst in flacon 1 (A1 op de injectietabel).
- De K-RAS Positive Control Codon 12 wordt in flacon 2 geplaatst (B1 op de injectietabel).
- De K-RAS Positive Control Codon 13 wordt in flacon 3 geplaatst (C1 op de injectietabel).
- De negatieve controle (geen DNA toegevoegd) wordt in flacon 4 geplaatst (D1 op de injectietabel).

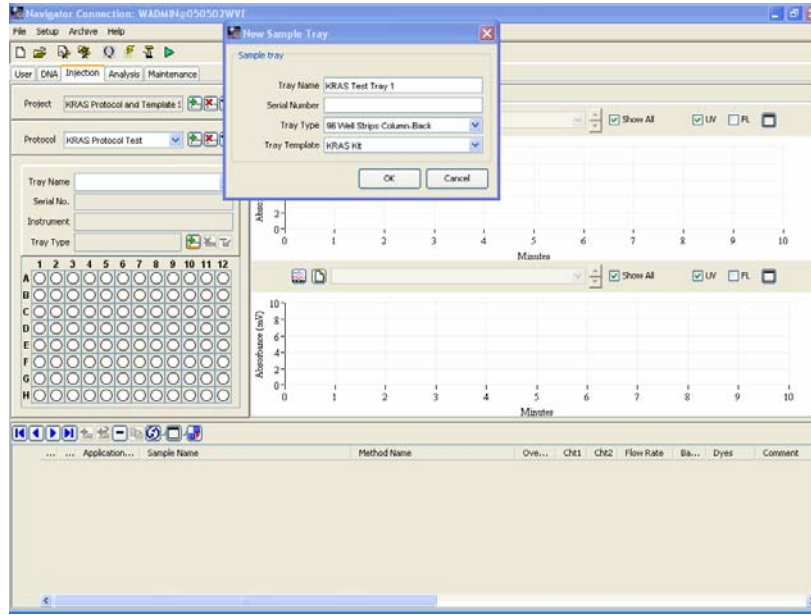
1. Ga voor het creëren van een nieuw protocol naar [File] uit de afrolmenubalk, selecteer [Protocol], vervolgens [Template].



**Figuur 12 Nieuwe protocolinstelling**

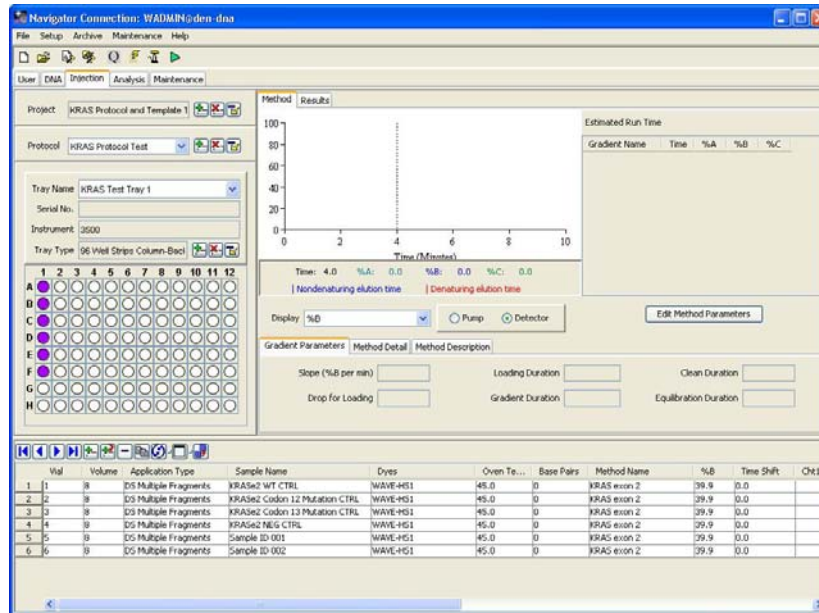
- a) Geef het protocol een naam.
  - b) Controleer of de Protocol Template "KRAS Exon 2 CE" is.
  - c) Voer het aantal te analyseren Subjects/Samples in.
  - d) Voer unieke Samples Names in voor elk van de Samples en selecteer [Save].
2. Selecteer een nieuw Tray Type voor het creëren van de injectietabel.
    - a) Voer de nieuwe Tray Name in.
    - b) Selecteer het Tray Type. Het Tray Type moet in kolomvorm zijn. Zie de Navigator Manual voor het opsporen en oplossen van problemen wanneer er geen plateau beschikbaar is.
    - c) Selecteer de K-RAS Kit Tray Template en selecteer [OK]

## Instructies voor gebruik van de SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD



**Figuur 13 Instellen van een nieuw monsterplateau**

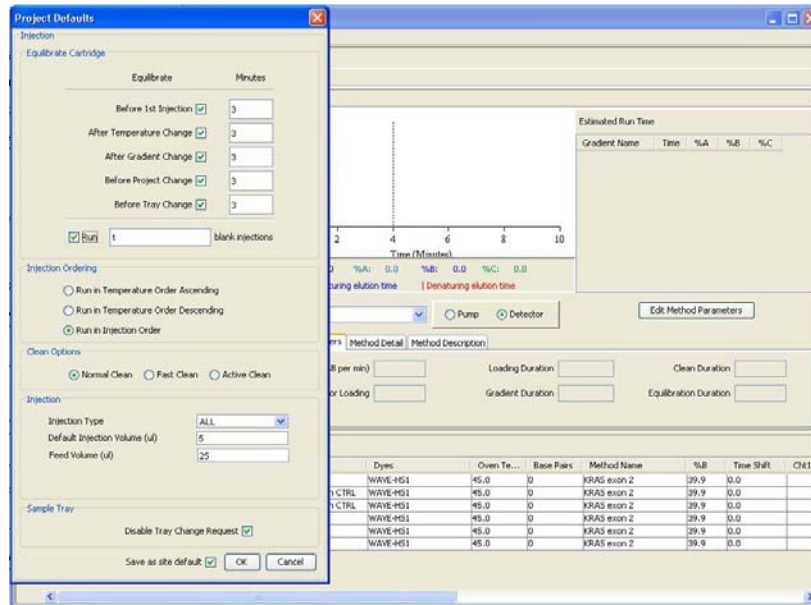
De plateautabel zal vervolgens worden ingevuld.



**Figuur 14 Een ingevuld monsterplateau**

- De bovenstaande screen-shot toont de invulling van de injectietabel met behulp van de K-RAS Exon 2 CE template voor het analyseren van 2 monsters.
- Monster 1 voor K-RAS Exon 2 dien in positie E1 (flacon 5) te worden geplaatst.

5. Om de HSD-pomp op bedrijfsdruk te brengen evenals het equilibreren van het systeem, moet voorafgaand aan monsteranalyse een blanco injectie worden gedraaid. Hiervoor moet u:
  - a) Onder [Set Up] op het afrolmenu [Project Defaults] selecteren.
  - b) Het Run-venster controleren onder Equilibrate Cartridge. Eén blanco injectie is voldoende.



**Figuur 15 Een blanco injectie draaien**

6. Flacon 96 (positie H12) kan worden gebruikt voor de WAVE DNA Sizing Standard. De Navigator Software Protocol functie kan niet worden gebruikt voor het genereren van injecties voor de Sizing Standard op elk van de gradiënten die worden gebruikt voor K-RAS-analyse. Voor het creëren van injecties van de Sizing Standard, twee rijen van de injectietabel die de K-RAS Exon 2 CE-methode gebruikt dupliceren. Verander de Sample Name in Sizing Standard.
7. Markeer de twee monsterrijen met de Sizing Standard en laat de twee geselecteerde injecties draaien. Druk opnieuw op de draaien-toets om de rest van de monsters te laten draaien (alle injecties in het plateau). Voorafgaand aan de Sizing Standard zal een blanco injectie worden gedraaid.

## Gradiënt voor K-RAS Exon 2

(maximale fragmentlengte = 400 bp)

Stap	Tijd	%A	%B
Laden	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

## Onderhoud van DNASep HT cartridges

### Wasprocedure

Bij het injecteren van SURVEYOR Nucleasedigesten op DNASep HT Cartridges in een WAVE System, zijn de aanbevolen reinigingsopties hetzij ACTIVE CLEAN of FAST CLEAN. **Een normale reiniging is niet voldoende.**

#### Let op het volgende:

- Elke 100 injecties met SURVEYOR Nucleatedigesten dient te worden gevolgd door een HOT WASH. Voor het uitvoeren van een HOT WASH bij 80 °C, pompt u gedurende 15 minuten 100% Solution D (75% (v/v) ACN), gedurende 30 minuten gevolgd door een wasbeurt door het systeem met een 1:1 mengsel van WAVE Optimized Buffers A en B. Deze HOT WASH dient ook aan het einde van elke batch SURVEYOR Nucleatedigesten te worden uitgevoerd, ongeacht of de 100 injecties zijn bereikt of niet, bijv. bij tijdelijk stoppen met het gebruik van een patroon of wanneer een verandering in DHPLC analyse wordt verwacht.
- De in-lijnfilter moet na elke 500 injecties met SURVEYOR Nucleatedigesten worden vervangen. De in-lijnfilter dient ook te worden vervangen wanneer de druk te hoog wordt (>1500 PSI voor DNASep HT Cartridges).
- Na elke 500 injecties dient een REVERSE HOT WASH te worden gegeven. Raadpleeg het onderstaande deel **Uitvoering van een REVERSE HOT WASH op een DNASep HT Cartridge.**

**WAARSCHUWING! Wanneer men zich niet aan deze procedures houdt, zal dit leiden tot hoge cartridgegedruk en zal de prestatie van de cartridge minder worden.**

### Een REVERSE HOT WASH geven op een DNASep HT Cartridge

Voor het uitvoeren van een REVERSE HOT WASH:

1. Verwijder de DNASep HT Cartridge en zet hem terug in de omgekeerde oriëntatie in de stromingsbaan.
2. Verwijder de in-lijnfilter en vervang hem tijdens de REVERSE HOT WASH door een koppelstuk.
3. Pomp gedurende 30 minuten bij 80 °C 100% Solution D (75% (v/v) ACN) door het systeem met een stromingssnelheid van 0,9 mL/min.
4. Pomp gedurende 1 uur bij 80 °C een wassing van een 1:1 mengsel van WAVE Optimized Buffers A en B door het systeem met een stromingssnelheid van 0,9 mL/min.
5. Verwijder het koppelstuk en zet een nieuwe in-lijnfilter in.

Deze REVERSE HOT WASH dient zonder de in-lijnfilter te worden uitgevoerd. Zet een nieuwe in-lijnfilter in na de REVERSE HOT WASH en laat de patroon gedurende de volgende 500 injecties in omgekeerde richting draaien.

## Contactgegevens

### Hoofdkantoor

Transgenomic, Inc.  
12325 Emmet Street  
Omaha  
Nebraska 68164  
Verenigde Staten

Telefoon: (888) 233-9283\* of 1 (402) 452-5400

Fax: +1 (402) 452-5401

E-mail: [SURVEYORscan@transgenomic.com](mailto:SURVEYORscan@transgenomic.com)

### Europa

Gemachtigde vertegenwoordiger binnen de EG

Transgenomic Limited  
40 Watt Road, Hillington Park, Hillington  
Glasgow G52 4RY, Verenigd Koninkrijk

Telefoon: +44 141 892 8800

Fax: +44 141 883 5967

E-mail: [SURVEYORscan@transgenomic.com](mailto:SURVEYORscan@transgenomic.com)

\*Alleen in Noord-Amerika

### ISO 9001: 2008 Certificatie

Transgenomic Inc opereert een Kwaliteitscontrolesysteem dat voldoet aan de vereisten van ISO 9001:2008 voor instrument- en bioconsumentenproductfabricage aangeboden voor genetische variatie, mutatiedetectie en andere unieke biomarkerassays, zoals gecertificeerd door BSI, certificaat # FM 538914

[www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)



**TRANSGENOMIC**<sup>®</sup>  
*the power of discovery*

## Handelsmerken & Copyright

Dit product is gefabriceerd onder exclusieve licentie volgens Amerikaanse octrooien 6,391,557; 5,869,245; en andere octrooien in behandeling. Voor het gebruik van SURVEYOR Nuclease heeft men een licentie nodig van Transgenomic. Academische organisaties zonder winst oogmerk of met winst oogmerk hebben bij aankoop van dit product beperkte rechten op het gebruik van SURVEYOR Nuclease voor researchdoeleinden. Doorverkoop of andere toepassingen zijn streng verboden. Neem contact op met Transgenomic voor verdere informatie.

DNA Polymerase: Het gebruik van dit product valt onder één of meer van de volgende Amerikaanse octrooien en overeenkomende octrooi-conclusies buiten de VS.: 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 en conclusies buiten de VS die overeenkomen met het Amerikaanse octrooi nr. 4,889,818. De aankoop van dit product omvat een beperkte, niet overdraagbare immuniteit tegen vervolging onder de bovengenoemde octrooi-conclusies voor het gebruik van alleen deze hoeveelheid product voor de eigen interne research van de onderzoeker. Geen recht onder enige andere octrooi-conclusie (zoals de gepatenteerde 5' Nuclease-procesconclusies in de Amerikaanse octrooien nr. 5,210,015 en 5,487,972) geen recht op het uitvoeren van enige gepatenteerde methode en geen recht op het uitvoeren van commerciële diensten van ongeacht welk soort, inclusief zonder beperking het rapporteren van de resultaten van de activiteiten van de koper voor een vergoeding of andere commerciële overweging, wordt uitdrukkelijk, door implicatie of door niet-ontvankelijk-verklaring tot uitdrukking gebracht. Dit product is uitsluitend bedoeld voor research. Voor diagnostische toepassingen onder octrooien van Roche is een afzonderlijke licentie van Roche nodig. Verdere informatie over de aankoop van licenties is verkrijgbaar door contact op te nemen met de Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Californië 94404, VS.

"TRANSGENOMIC", "the power of discovery", "WAVE", "SURVEYOR", "WAVEOptimized", "DNASep" en het globe-logo zijn gedeponeerde handelsmerken en "Navigator" is een handelsmerk van Transgenomic, Inc. Alle andere handelsmerken zijn handelsmerken van hun respectievelijke houders.

©2010 Transgenomic, Inc. Alle rechten voorbehouden. Gedrukt in de VS.

Documentonderdeel Nr. 482276-DU-04