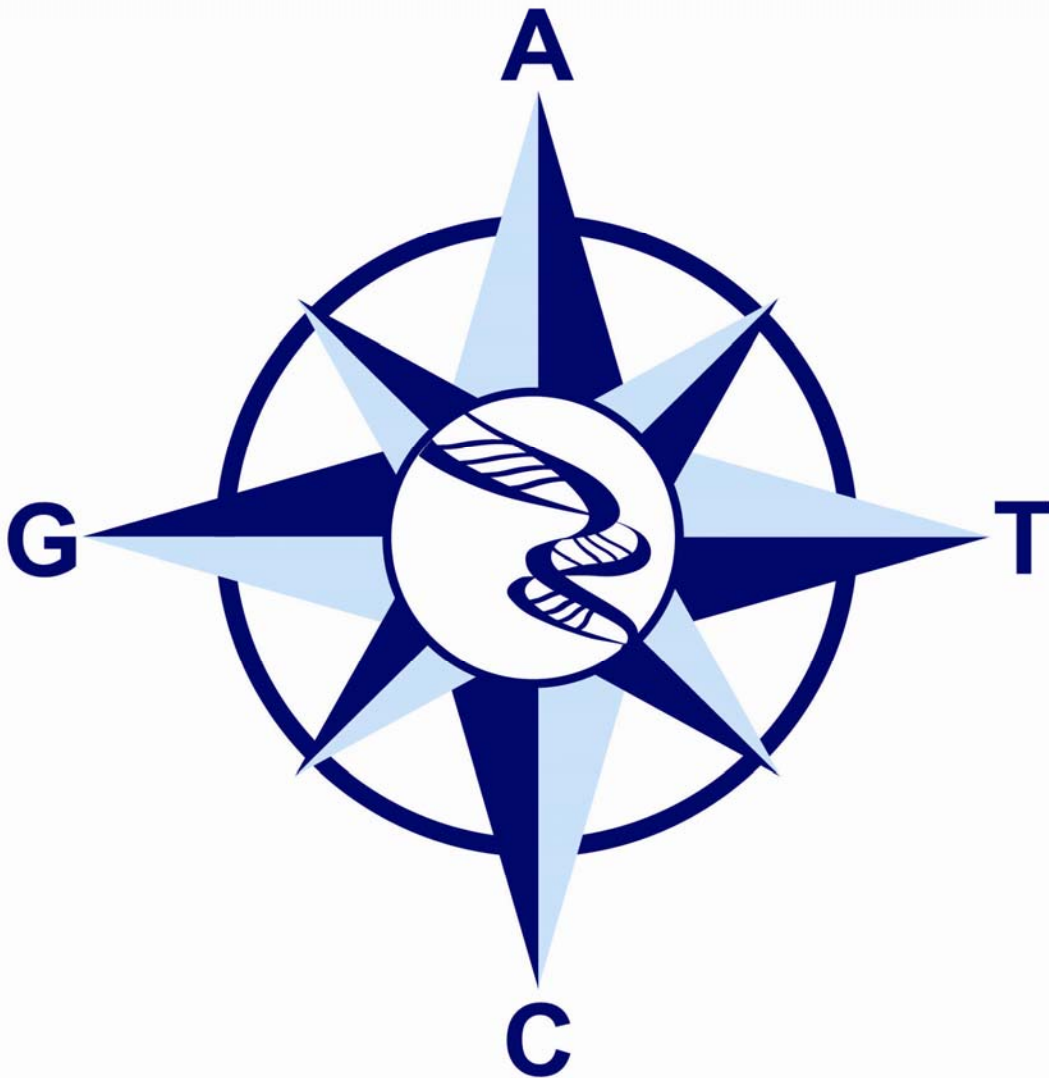




TRANSGENOMIC®

the Power of Discovery®

Gebrauchsanleitung für das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD



www.transgenomic.com

Inhalt

Hersteller.....	2
SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	2
Verwendungszweck	2
Hinweise zum Gebrauch	2
Testprinzip des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	2
K-RAS.....	2
SURVEYOR Nuclease	3
Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen	4
Kit-Komponenten	4
Probenanzahl.....	5
DNA-Sequenzierung	5
Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien	5
Reagenzienvorbereitung	6
Lagerung und Haltbarkeit nach Erstgebrauch des Kits.....	6
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6
Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung	6
Testverfahren	7
Somatischer Mutationsnachweis mit dem SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i> - Ein Überblick.....	7
Schritt-für-Schritt-Anleitung	7
Installieren des K-RAS Protokolls auf dem WAVE HS System	7
WAVE System INBETRIEBNAHME/ Säulenkalibrierung (Navigator Software) für SURVEYOR Nuclease-Anwendungen.....	7
WAVE System INBETRIEBNAHME/Ofenkalibrierung.....	7
WAVE HT HS - Überlegungen vor Beginn der K-RAS-Probenanalyse	8
Überlegungen zu den Matrizen	8
Primerdesign.....	8
Amplifikationsprotokoll	8
Thermocycler-Programm für Amplifikationsprotokoll	10
Qualitätskontrolle der PCR-Produkte	10
SURVEYOR Nuclease-Verdau	10
Überlegungen zum Arbeitsablauf	11
Kontrollverfahren.....	11
Qualitätskontrolle des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	11
Verwendung der K-RAS Kontrollplasmid-DNAs	12
Interpretation der Ergebnisse	13
Analyse des K-RAS Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease	13
Beispielergebnisse.....	14
Leistungsmerkmale	15
Nachweisgrenze des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit <i>CE IVD</i>	15
Verdünnungsreihen zur Nachweisgrenze der K-RAS Exon 2 G12S Mutation	16
Verdünnungsreihen zur Nachweisgrenze der K-RAS Exon 2 G13D Mutation.....	17
Interpretation von Proben mit Mutationen geringer Prozentzahl.....	17
Verfahrensbeschränkungen	19
Literaturnachweis	19
Anhang A	21
Fehlersuche	21
Anhang B	24
WAVE System INBETRIEBNAHME/ Säulenkalibrierung (Navigator Software) für SURVEYOR Nuclease-Anwendungen.....	24
WAVE HS System-Parameter für das K-RAS Protokoll	26
Gradient für K-RAS Exon 2	30
Wartung der DNASep HT Cartridges	31
Waschverfahren.....	31
Durchführung eines REVERSE HOT WASH an einer DNASep HT Cartridge.....	31
Kontakt.....	32
Marken und Copyright.....	32

Hersteller

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* wird durch die Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164 (USA) hergestellt. Tel. +1 402 452 5400.
Handelsbevollmächtigt für die EU ist die Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, Vereinigtes Königreich. Tel. +44 141 892 8800.

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

Dieses Kit wird in einem Karton geliefert, der die nachstehend aufgeführten Komponenten enthält.
Diese Gebrauchsanleitung ist als Download erhältlich.

Verwendungszweck

Anwendung nur durch Fachpersonal. Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* von Transgenomic ist ein *In-vitro*-Diagnostikum, das Mutationen in Exon 2 des K-RAS-Gens nachweist. Die Mutationen in Codon 12 und 13 werden durch charakteristische Testergebnisse angezeigt. Dieses Kit ist für den Gebrauch in einem Labor für klinische Diagnostik durch entsprechend ausgebildetes Fachpersonal vorgesehen. Getestet wird DNA, die aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert wird.

Hinweise zum Gebrauch

Ärzte können das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* für die Entscheidungsfindung einsetzen, ob Patienten mit kolorektalem Karzinom auf eine Therapie mit Anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor bzw. epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Therapeutika wie Vectibix[®] oder Erbitux[®] ansprechen.

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* **darf nicht** zur Diagnose von kolorektalen oder anderen Krebsarten verwendet werden.

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* weist auf die Anwesenheit von Mutationen im K-RAS-Gen Exon 2 hin, bestätigt aber nicht die Sequenzidentität der Mutation. Um nachzuweisen, um welche Mutation es sich genau handelt, sind weitere Untersuchungen, wie beispielsweise eine DNA-Sequenzierung, erforderlich.

Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten für den Arzt ein Hinweis auf den Mutationsstatus eines Patienten sein. Es müssen weitere klinische Faktoren berücksichtigt werden; die Ergebnisse des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* **dürfen nicht als einzige Methode zur Entscheidungsfindung einer Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom herangezogen werden.** Durch diesen Kit positiv getestete Proben sollten durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

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

K-RAS

Neu entwickelte, auf den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerichtete therapeutische Wirkstoffe wie Cetuximab (Erbitux) und Panitumumab (Vectibix) haben sich bei kolorektalem Karzinom als wirksam erwiesen. Bei einigen bestimmten kolorektalen Krebsarten sind diese Medikamente allerdings nicht wirksam. Von diesen Tumoren tragen ungefähr 40% K-RAS-Genmutationen, die mit dem schlechten Ansprechen auf EGFR-Antagonisten in Verbindung gebracht wurden. Der K-RAS-Mutationsstatus kann daher eingesetzt werden, um zu bestimmen, ob ein Tumor auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen wird.

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* ist ein diagnostisches Testkit für den Nachweis aller Sequenzen und kleiner Insertions-/Deletionsmutationen in Exon 2 des K-RAS-Gens. Positivkontrollen für Exon-2-Mutationen in Codon 12 und 13, die mit der mangelnden Wirksamkeit der Anti-EGFR-Wirkstoffe in Verbindung gebracht wurden, werden mitgeliefert.

Dieses Kit verwendet die patentrechtlich geschützten Technologien, die SURVEYOR Nuclease und das WAVE HS System von Transgenomic, die einen einfachen und empfindlichen Mutationsnachweis bieten, und ein Gemisch aus 1 % mutanter vor einem Hintergrund von 99 % nicht-mutanter DNA nachweisen können. Validierungsuntersuchungen haben eine extrem hohe Übereinstimmung mit der Sequenzierung von gut untersuchten kolorektalen Tumorproben gezeigt. Zudem sind die resultierenden Verdauungsmuster der SURVEYOR Nuclease für Codon 12 und 13 hoch spezifisch. Durch die Verwendung des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* reduziert sich für den Anwender die Sequenzierungsarbeit und ermöglicht darüber hinaus aggressive Sequenzzuordnung, wo eine automatische Sequenzierungssoftware eine Mutation oft nicht klären kann.

SURVEYOR Nuclease

Die SURVEYOR Nuclease von Transgenomic ist eine mismatch-spezifische Pflanzen-DNA-Endonuclease, die Heteroduplex-DNA auf bekannte und unbekannte Mutationen und Polymorphismen durchsuchen kann. Das Enzym schneidet mit hoher Spezifität einen DNA-Doppelstrang an Stellen wo durch einen Basenaustausch oder andere Sequenzveränderungen. Basen nicht miteinander paaren koennen (DNA-Mismatch, Heteroduplex). Die DNA-Endonuclease schneidet beide Stränge des DNA-Heteroduplex am 3'-Ende des Mismatch-Ortes¹. Insertion-/Deletionsmismatches und alle Basensubstitutionsmismatches werden erkannt, doch variiert die Effektivität der Spaltung mit der Sequenz des Mismatches^{1,2}.

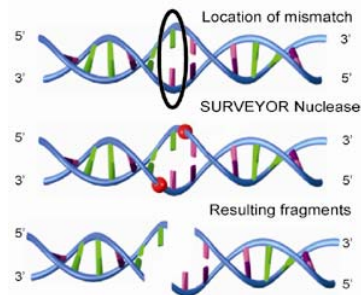


Abbildung 1. Wirkungsweise der SURVEYOR Nuclease Die Endonuclease erkennt ein Mismatch und spaltet am 3'-Ende der Mismatch-Basen. Damit wird der DNA-Doppelstrang gespalten, was einen einzigen 3'-Basenüberhang hinterlässt.

Die SURVEYOR Nuclease wurde in einer ganzen Reihe von Projekten eingesetzt, um in Genen eine Vielzahl von Mutationen und Polymorphismen nachzuweisen⁵. Insbesondere wird die SURVEYOR Nuclease verwendet, um bekannte Mutationen in einer Reihe von Genen zu bestätigen, die mit Nieren-³, Lungen-^{4, 9, 10,12-15}, Kopf- und Halskrebs⁶ sowie Leukämie^{7, 16, 17} und Endometriumkarzinom⁸ in Verbindung gebracht werden. Ebenso wurde das Enzym zur Ergebnisprognose einer Strahlentherapie eingesetzt¹¹.

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* für WAVE HS Systeme ist zur Spaltung von Mismatches im K-RAS Exon 2 und der anschließenden Analyse durch die Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC mit den WAVE HS Systemen vorgesehen.

Hinweis: Für diesen Test ausschließlich die mit diesem Kit mitgelieferte DNA-Polymerase verwenden.

Hinweis: Die in dieser Gebrauchsanleitung besonders empfohlenen Waschverfahren für das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* für WAVE HS Systeme und die Verwendung von DNASep HT-Säulen unterscheiden sich von den normalen WAVE DHPLC-Verfahren. Befolgen Sie bitte alle Empfehlungen in dieser Anleitung, um eine optimale Leistung Ihres WAVE HS Systems zu erhalten.

Um dieses Kit erfolgreich einzusetzen, wird dringend angeraten, diese Gebrauchsanleitung aufmerksam durchzulesen und alle darin gegebenen Anleitungen und Richtlinien genau zu befolgen. Personen, die diesen Test zum ersten Mal durchführen, sollten die im Abschnitt

"Verwenden der K-RAS Kontrollplasmid-DNAs" auf Seite 13 beschriebenen Kontrolluntersuchungen durchführen.

Falls Sie weitere Fragen haben oder Hilfe benötigen, rufen Sie in Europa **+44 (0) 141 892 8800** an und fragen nach dem "K-RAS Support". Alternativ können Sie eine E-Mail senden an:

SURVEYORscan@transgenomic.com

Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen

Die mit diesem Kit mitgelieferten Kontrollen sind Plasmidklone der K-RAS Exon-2-Sequenzen. Alle Klone wurden sequenziert, um sie im Vergleich zur NCBI-Referenzsequenz auf Sequenztreue zu überprüfen. NG_007524.1.

Die K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 wurde durch PCR des K-RAS Exon 2 aus einer genomischen Wildtyp-DNA-Präparation und Klonierung konstruiert.

Die K-RAS Positive Control Codon 12 wurde durch ortsspezifische Mutagenese der K-RAS-Kontrolle konstruiert: Wild-Type Exon 2-Klon. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 12 in einer GGT>AGT-Alteration vorliegt.

Die K-RAS Positive Control Codon 13 wurde durch ortsspezifische Mutagenese der K-RAS Control konstruiert: Wild-Type Exon 2-Klon. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz bei Codon 13 in einer GGC>GAC-Alteration vorliegt.

Nähere Angaben zu den DNA-Sequenzen der Kontrollen siehe **Verwendung der K-RAS Kontrollplasmid-DNAs** auf Seite 13.

Kit-Komponenten

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit CE IVD besteht aus einem Karton mit 16 Reagenzgefäßen. In jedem Karton bleiben 4 Löcher leer.

Katalognummer	Kit-Komponente	Kit für 100 Testreaktionen (710101-CEIVD) Gelieferte Menge
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 Gefäße)	2 x 250 µL
710151R	K-RAS-Primer: Exon 2 Reverse (10 µM) (2 Gefäße)	2 x 250 µL
710160	SURVEYOR Nuclease W (2 Gefäße)	2 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	105 µL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	105 µL
708027	0.15 M MgCl ₂ Solution	105 µL
708030	Stop Solution	250 µL
710141	K-RAS Control: Wild-Type Exon 2	40 µL
710143	K-RAS Positive Control Codon 12	40 µL
710144	K-RAS Positive Control Codon 13	40 µL

482276 Benutzerhandbuch Download von der Website*

http://www.transgenomic.com/pd/surveyor/SurveyorKRAS_CEIVD_ug.asp

Probenanzahl

Mit dem SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* können 100 Reaktionen getestet werden. Die Gesamtprobenanzahl hängt von der Größe der jeweiligen durchschnittlichen Seriengrößen zu testender Proben ab, da mit jeder Probenserie jeweils ein Satz Kontrollen getestet werden muss.

In der nachstehenden Tabelle ist die Anzahl Proben aufgeführt, die mit dem K-RAS Kit je nach durchschnittlicher Seriengröße getestet werden können. Die Berechnung beruht auf der Basis, dass jede Serie 4 Kontrollen benötigt und jedes Kit für 100 Reaktionen ausgelegt ist.

Mit Ansteigen der Seriengröße erhöht sich auch die Anzahl der Proben, die insgesamt getestet werden können, was die durchschnittlichen Reagenzienkosten je Probe reduziert.

Seriengröße	Anzahl der Kontrollen + Probenamplikons	Tests/Lauf	Gesamttestläufe/Kit	Getestete Proben/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-Sequenzierung

Für die PCR-Amplifikation des K-RAS Exon 2 ist ausreichend Primer vorhanden und kann bei Bedarf ebenfalls zur DNA-Sequenzierung aller getesteten Proben verwendet werden.

Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien

Folgende Komponenten bzw. Ausrüstung sind für die Durchführung des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* zusätzlich erforderlich:

WAVE System (Modell 3500HT oder 4500HT), WAVE HSD-Zubehör, DNASep HT Cartridge (Transgenomic AN DNA-99-3710), WAVE Optimized[®] Buffers (Buffer A, Buffer B und Solution D haben die Transgenomic AN 553401, 553402 bzw. 553412, Syringe Wash Solution [für Modell 3500-Systeme] und HS Staining Solution I haben die AN 553411 bzw. 553442), 0,2-ml-PCR-Reaktionsgefäße, 2,0-ml-Gefäße für Mikrozentrifuge, Mikropipetten, Pipettenspitzen, WAVE DNA Sizing Standard (Transgenomic AN 560078), 100-Basenpaarleiter, hochreines Wasser für die Molekularbiologie, Eisbad, Vortexer, Mikrozentrifuge, Thermocycler, Agarosegele und Ausrüstung für Agarosegelelektrophorese.

Reagenzienvorbereitung

Alle Reagenzien dieses Kits sind gebrauchsfertig. Einige Komponenten müssen vor Gebrauch aufgetaut, mit dem Vortexer gemischt oder in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden. Einzelheiten siehe weiter unten unter Testverfahren. Reagenzien müssen zur Herstellung von Master-Mix und Reaktionsgemischen gemischt werden. Genaue Anleitung finden Sie im Abschnitt Testverfahren auf Seite 7.

Lagerung und Haltbarkeit nach Erstgebrauch des Kits

Das Kit muss bis zum Gebrauch bei -18 °C bis -25 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Achten Sie bei jedem erhaltenen Kit auf das Verfallsdatum. Das Kit nicht mehr verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.

Das in Schritt 7 des SURVEYOR Nuclease-Verdau (Seite 11) vorbereitete SURVEYOR Nuclease-Gemisch muss sofort verwendet werden, da die Anwesenheit anderer Komponenten im SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch die SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiviert.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Keines der Reagenzien in diesem Kit stellt in den gelieferten Mengen eine Gesundheitsgefährdung dar. Das Sicherheitsdatenblatt von Transgenomic MSD-710101-CEIVD steht als Download zur Verfügung:

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

Dieses Kit enthält keine Substanzen tierischen oder menschlichen Ursprungs, die ein Infektionsrisiko darstellen können.

Dieses Kit darf nur von Personen verwendet werden, die in den entsprechenden Labortechniken ausgebildet wurden. Beim Arbeiten mit den Kitkomponenten immer einen geeigneten Labormantel, Einmalhandschuhe und Augenschutz tragen. Nach Gebrauch müssen die Kitkomponenten als klinischer Abfall und gemäß der für Sie anwendbaren Gesetze und Verordnungen entsorgt werden.

Aus den Gefäßen pipettierte Reagenzialiquots dieses Kits sind nur zum Einmalgebrauch bestimmt. Es konnte validiert werden, dass Kitkomponenten auch nach 25 Auftau-/Einfrierzyklen noch stabil sind. Das Kit nicht verwenden, wenn diese Anzahl Zyklen überschritten wurde.

Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung

Das SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* benötigt DNA, die aus formalinfixierten, paraffineingebetteten kolorektalen Tumorproben extrahiert wurde. Um für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits die wichtigsten Qualitätskontrollwerte zu erhalten, muss die extrahierte DNA folgenden Anforderungen genügen:

- Q-PCR der extrahierten DNA muss anzeigen, dass eine amplifizierbare Matrize vorhanden ist.
- Das 260:280 Absorptionsverhältnis muss $>1,80$ sein.
- Die Matrizenkonzentration jeder Proben muss $25\text{ ng}/\mu\text{L}$ betragen.

Extrahierte DNA-Proben, die mit diesem Kit nicht sofort analysiert werden, müssen bei -20 °C aufbewahrt werden.

Testverfahren

Somatischer Mutationsnachweis mit dem SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* - Ein Überblick

Nachweis und Bestätigung einer Mutation mit der SURVEYOR Nuclease umfasst vier Schritte:

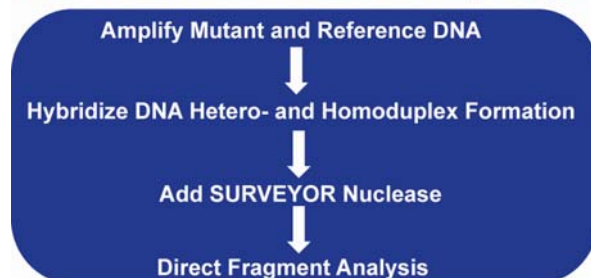
Schritt 1 - Vorbereiten der PCR-Amplikons aus mutanter (Test) und normaler (Referenz) DNA.

Schritt 2 – Anschließend an den letzten PCR-Amplifikationszyklus wird zum Schmelzen sämtlicher Doppelstränge das PCR-Produkt erhitzt und dann zur optimalen Bildung von Hetero- und Homoduplexes langsam abgekühlt.

Schritt 3 - Behandlung des hybridisierten Heteroduplex-Homoduplex-Gemisch mit SURVEYOR Nuclease. Die gleichbehandelte Referenz-DNA dient als Hintergrundkontrolle.

Schritt 4 - Analyse der DNA-Fragmente mit dem WAVE HS System. Die Bildung neuer Spaltprodukte aufgrund von einem (bzw. mehreren) Mismatch wird durch die Anwesenheit weiterer Peaks angezeigt. Die Retentionszeit der Spaltprodukte weist auf die Größe der Fragmente und daher den Ort des/der Mismatches hin.

Mutation Detection in Four Easy Steps



Schritt-für-Schritt-Anleitung

Installieren des K-RAS Protokolls auf dem WAVE HS System

Für ein schnelles und einfaches Setup in der Navigator™ Software kann das K-RAS Exon 2 CE-Protokoll für das WAVE HS System heruntergeladen werden. Gehen Sie dafür auf: <http://www.transgenomic.com/sp/sw/nav/K-RAS%20Protocol/K-RAS%20ProtocolCEIVD.asp> und folgen den Anweisungen des K-RAS-Protokolls und der Verifizierungsverfahren.

WAVE System INBETRIEBNAHME/ Säulenkalibrierung (Navigator Software) für SURVEYOR Nuclease-Anwendungen

Siehe **Anhang B - WAVE System INBETRIEBNAHME/ Säulenkalibrierung (Navigator Software) für SURVEYOR Nuclease-Anwendungen** in diesem Benutzerhandbuch.

WAVE System INBETRIEBNAHME/Ofenkalibrierung

Siehe die WAVE Operator's User Manual für Verfahren zur Ofenkalibrierung. **Es werden monatliche Kalibrierungen empfohlen.**

WAVE HT HS - Überlegungen vor Beginn der K-RAS-Probenanalyse

1. Vor einem Probenlauf muss auf dem K-RAS-Gradienten der WAVE DNA Sizing Standard durchgeführt werden (**Anhang B – Gradient für K-RAS Exon 2**), um die ordnungsgemäße Funktionsweise des Systems zu sichern.

Überlegungen zu den Matrizen

1. Verwenden Sie für die FFPE isolierte Matrizen-DNA die üblichen Labortechniken, um die Qualität und Quantität der extrahierten DNA zu bewerten, und um zu gewährleisten, dass für die PCR eine amplifizierbare Matrize vorhanden ist.
2. Das 260:280 Absorptionsverhältnis muss >1,80 sein.
3. Die Gebrauchskonzentration der Matrize in allen Proben sollte 25 ng/µL betragen. Verdünnen Sie ggf. die Matrizen-DNA mit hochreinem Wasser für die Molekularbiologie.

Primerdesign

1. Die Sequenzen der in diesem Kit gelieferten Primer sind wie folgt:

Amplikon		Sequenz
Exon 2	Forward	cggGTTTGTATTTAAAAGGTACTGGTGGAGT
	Reverse	cgggTTTATCTGTATCAAAGAATGGTCCT

Hinweis: Die Primer enthalten kleine GC-Clamps. Das 5'-Ende des Exon 2 ist sehr AT-reich.

2. Die Amplikonsequenzen sind wie folgt:
 - a. Forward-Primer sind **Grün** markiert. Reverse-Primer sind **Rot** markiert. Kodierende Regionen sind **Grau** und die häufigsten Mutationsregionen sind **Violett** markiert. Großbuchstaben, die nicht markiert sind, sind nichtkodierende cDNA-Bereiche.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2

MD-Loci: 10428 - 10706

Größe: 286 bp

cgggTTTGTATTTAAAAGGTACTGGTGGAGTatttgatagtgattaaccttatgtgacatgttctaataatagtcacattttcattat
 attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT**[G/A]**GTGGCG**
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT
CCAACAATAGAGgtaaatctgttttaaatgcatattactgggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

Amplifikationsprotokoll

1. Die vorgemischte dNTP-Lösung (AN 703065) wird in einer Gebrauchskonzentration von 10 mM Gesamtdeoxynucleotid (je 2,5 mM der vier Deoxynucleotide) geliefert.
2. Die Forward- und Reverse-Primer (AN 710151F bzw. 710151R) der einzelnen Amplikons werden bei 10 µM geliefert.
3. Nehmen Sie die 10-µM-Primer, 10 mM vorgemischte dNTP-Lösung und den DNA Polymerase 10X PCR Buffer (AN 703315) aus dem Gefrierschrank und lassen alles auf Eis auftauen.
4. Bereiten Sie auf Eis den Master-Mix vor.

5. Bereiten Sie den Master-Mix für K-RAS Exon 2 anhand der folgenden Tabelle vor:

Anzahl der Reaktionen:	1.00
Volumenberechnung:	
Volumen Wasser (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
Gesamtvolumen Master-Mix:	48.0
Volumen hinzuzufügender extrahierter DNA (µL bei 25)ng/µL)	2.0**
Gesamtvolumen PCR-Reaktion:	50.0

**Hinweis: Erhöhen Sie für extrahierte DNA-Konzentrationen von <25 ng/µL proportional das Volumen extrahierter DNA und reduzieren ebenfalls das Volumen an Wasser in dem Master-Mix um dieselbe Menge, um je Reaktion 50 µL zu erhalten. Alle mit diesem Master-Mix vorbereiteten Proben müssen extrahierte DNA enthalten, die auf ungefähr derselben niedrigsten Konzentrationsstufe verdünnt wurde. Es ist nicht empfehlenswert, Konzentrationen extrahierter DNA von <5 ng/µL einzusetzen.

6. Berechnen Sie das erforderliche Volumen für den Master-Mix, indem Sie die in der Tabelle oben angegebenen Volumina mit der Gesamtzahl zu testender Proben, plus 4 zusätzlichen Reaktionen für die Kontrollen, multiplizieren.
7. Beschriften Sie 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße oder die Wells einer 96-well Platte mit den erforderlichen Probeninformationen.
8. Beschriften Sie ein 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen für den vorbereiteten Master-Mix.
9. Fügen Sie diesem Zentrifugenröhrchen das erforderliche Volumen hochreinen Wassers für die Molekularbiologie hinzu.
10. Mischen Sie den DNA Polymerase 10X PCR Buffer für ca. 10 s mit dem Vortexer.
11. Fügen Sie dem 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen die erforderliche Menge DNA Polymerase 10X PCR Buffer hinzu.
12. Mischen Sie 10,0 mM vorgemischte dNTP-Gebrauchslösung für ca. 10 s mit dem Vortexer.
13. Fügen Sie dem 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen das erforderliche Volumen der 10,0 mM vorgemischten dNTPs-Gebrauchslösung hinzu.
14. Fügen Sie das benötigte Volumen K-RAS Primer hinzu: Exon 2 Forward zum 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen.
15. Fügen Sie das benötigte Volumen K-RAS Primer hinzu: Exon 2 Reverse zum 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen.
16. Nehmen Sie die DNA Polymerase (AN 703310) aus dem Gefrierschrank.
17. Zentrifugieren Sie die DNA Polymerase für ca. 10 s.
18. Mischen Sie die DNA Polymerase für ca. 10 s mit dem Vortexer.
19. Fügen Sie dem 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen das erforderliche Volumen DNA-Polymerase hinzu.
20. Das 2,0-ml-Zentrifugenröhrchen mit Master-Mix verschließen.
21. Vor dem Gebrauch das 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen für ca. 30 s mit dem Vortexer mischen.
22. Bis zum Gebrauch auf Eis lagern.
23. Pipettieren Sie 48,0 µL Master-Mix in die entsprechenden Wells. Dabei bei Verwendung einer Einkanalpipette jedesmal die Spitze wechseln. Wenn Sie eine Dispenserpipette verwenden, achten Sie darauf, dass von Well zu Well nichts verspritzt wird. Halten Sie die Platte auf Eis.

24. Fügen Sie in die entsprechenden Wells je 2,0 µL der Probenmatrizen-DNAs, der Kontrollmatrizen-DNAs (AN 710140, 710143, 710144) bzw. matrizenfreie Kontrolle (Wasser) hinzu.
25. Nach Abschluss dieses Pipettierschritts verschließen Sie jedes Well mit dem 8-Verschlussstreifen (bei Verwendung einer 96-well Platte) bzw. die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße mit ihren Deckeln. Achten Sie darauf, dass die Deckel fest verschlossen sind.
26. Mit dem Vortexer (ca. 1/2 Geschwindigkeit) für 30 s mischen.
27. Kontrollieren Sie die Platten bzw. 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße. Prüfen Sie nach, ob sich die Lösung auf dem Boden der Wells befindet. Falls nicht, noch einmal zentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren die Geschwindigkeit des Vortexer reduzieren und für ca. 15 s mischen.

Thermocycler-Programm für Amplifikationsprotokoll

1. Verwenden Sie folgendes Thermocycler-Protokoll für die PCR-Amplifikation und Bildung der Heteroduplices:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
15 Zyklen Touchdown	95 °C	30 sec
	62 °C, -0,5 °C/Zyklus	30 sec
	72 °C	25 sec
30 Zyklen Amplifikation	95 °C	30 sec
	55 °C	30 sec
	72 °C	25 sec
Finale Extension	72 °C	2 min
Heteroduplexbildung	95 °C	2 min
	4 °C	Hold

Qualitätskontrolle der PCR-Produkte

1. Bevor Sie mit dem SURVEYOR Nuclease-Verdau fortfahren, müssen Qualität und Quantität des Amplikons durch Gelelektrophorese oder WAVE DHPLC geprüft werden.
2. Analysieren Sie ein Aliquot des PCR-Produkts zusammen mit mehreren verschiedenen Mengen einer 100-Basenpaarleiter.
3. Verwenden Sie die Basenpaarleiter, um die Konzentration amplifizierter DNA zu berechnen.
4. Es sollte nur eine einzige, dem Hauptprodukt entsprechende Bande >20 ng/µL verzeichnet werden.
5. Falls mehrere Banden vorhanden sind, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe **Anhang A – Fehlersuche**).
6. Falls kein Produkt zu sehen ist, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe **Anhang A – Fehlersuche**). Wenn die Qualität den Spezifikationen entspricht, erhöhen Sie das Volumen der Matrize auf 4,0 µL je 50 µL Reaktion (verringern Sie das Verhältnis Wasser-Reaktion auf 31,0 µL).
7. In der Kontrollprobe ohne Matrize dürfen keine PCR-Produkte zu sehen sein. Wenn DNA-Produkte nachweisbar sind, ist diese Kontrolle wahrscheinlich kontaminiert. Siehe Fehlersuche auf Seite 22.

SURVEYOR Nuclease-Verdau

Nachdem die Probe-PCR sich in Qualität und Quantität als ausreichend erwiesen hat, führen Sie die SURVEYOR Nuclease-Verdauungsreaktion wie nachstehend beschrieben durch.

1. Tauen Sie die 0.15 M MgCl₂ Solution und den SURVEYOR Enhancer Cofactor auf Eis auf.

2. Pipettieren Sie 10,0 µL Probe in ein neues 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße bzw. Well einer 96-well Platte.
3. Falls Sie mehrere Proben ansetzen, stellen Sie einen frischen Ansatz 0.15 M MgCl₂ Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Nuclease W (SURVEYOR Nuclease-Gemisch) her.
 - a. Vor dem Gebrauch jedes Reagenz zentrifugieren.
 - b. Vor dem Pipettieren leicht vortexen.
 - c. Geben Sie für jeden Verdau folgende Komponenten in ein 0,2-ml-PCR-Reaktionsgefäß (oder größer):
 - 1,0 µL 0.15 M MgCl₂ Solution (AN 708027)
 - 1,0 µL SURVEYOR Enhancer Cofactor (AN 708049)
 - 1,0 µL SURVEYOR Enhancer W2 (AN 710161)
 - 2,0 µL SURVEYOR Nuclease W (AN 710160)
4. Zentrifugieren Sie das SURVEYOR Nuclease-Gemisch für 10s auf niedriger Geschwindigkeit.
5. Vortexen Sie das SURVEYOR Nuclease-Gemisch leicht für 10s auf niedriger Geschwindigkeit.
6. Legen Sie das SURVEYOR Nuclease-Gemisch bis zur Weiterverarbeitung auf Eis.
7. Pipettieren Sie je 5,0 µL Aliquot des SURVEYOR Nuclease-Gemisch zu den 10,0 µL hybridisierten PCR-Produkt.
8. Zentrifugieren Sie nach Abschluss dieses Pipettierschritts die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße bzw. 96-well Plate für 10 s.
9. Vortexen Sie die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße oder 96-well Platte leicht für 10s.
10. Bei 42 °C für **30** min. inkubieren.
11. Fügen Sie jedem Reaktionsgefäß bzw. Well 1,0 µL Stop Solution (AN 708030) hinzu und vortexen es leicht (Gesamtvolumen der SURVEYOR Nuclease-Reaktion beträgt 16,0 µL).
12. Injizieren Sie 8,0 µL jeder verdauten Probe mit den angegebenen Gradienten. Siehe **Analyse des K-RAS Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease** auf Seite 14.

Hinweis: Das in Schritt 7 vorbereitete SURVEYOR Nuclease-Gemisch muss sofort verwendet werden, da die Anwesenheit anderer Komponenten im SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch die SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiviert.

Überlegungen zum Arbeitsablauf

Mit dem Kit können Mutationsanalysen für 100 Proben durchgeführt werden. Die Abbildung 11 zeigt das Layout einer 96-well Platte mit Kontrollen und 92 Proben. Es können auch Testläufe mit weniger Proben ausgeführt werden, allerdings müssen Kontrollen und der WAVE DNA Sizing Standard jedesmal mitgeführt werden. Dieses Kit verfügt über ausreichend Kontrollmaterial für sämtliche Kombinationen von möglichen Proben-Batch-Größen.

Im Allgemeinen sollte die Probenverarbeitung von Anfang bis Ende wie in diesem Benutzerhandbuch beschrieben ausgeführt werden. Falls die Verarbeitung einer Probe vor dem Abschluss aller Schritte unterbrochen wird, muss die DNA bei -20 °C gelagert werden, bis der nächste Schritt ausgeführt wird. Eingefrorene Proben dürfen allerdings keinen wiederholten Einfrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt werden. Eine Aufbewahrung von PCR-amplifizierter DNA oder SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukten bei -20 °C für einen längeren Zeitraum (>1 Woche) ist zu vermeiden.

Kontrollverfahren

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

Zur Qualitätskontrolle bestimmter Schritte des Testverfahrens sind diesem Kit Kontrollplasmid-DNAs beigefügt. Für das Amplifikationsprotokoll (Seite 8) bieten diese Kontrollen die Möglichkeit zu

gewährleisten, dass der Master-Mix korrekt vorbereitet und die Amplifikation richtig funktioniert hat. Matrizenfreie Kontrollen (wo anstelle der Matrizen-DNA Wasser hinzugefügt wird) werden ebenfalls empfohlen, um eine mögliche Kontamination der Kitkomponenten mit einer DNA-Matrize nachzuweisen.

Bei dem Schritt des SURVEYOR Nuclease-Verdauens zeigen die Amplifikate dieser 3 Kontrollplasmid-DNAs effektiv, ob die Bedingungen der Spaltungsreaktion (Vorbereitung des SURVEYOR Nuclease-Gemisches und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Bei der Analyse liefern die Chromatogramme dieser SURVEYOR Nuclease verdauten Kontrollamplikons auf dem WAVE-System einen Hinweis darauf, wo die Codon 12- und 13-Mutationen, auch bei niedrigem Vorkommen, eluieren werden (siehe Abbildungen 3 und 4).

Wenn weder die PCR-Amplikons noch die SURVEYOR Nuclease-Spaltfragmente aus den Kontrollplasmid-DNAs den Ergebnisse der Qualitätskontrolle der PCR-Produkte (Seite 11) oder den Beispielergebnissen (Seite 14) entsprechen, schlagen Sie in der Fehlersuche im Anhang A nach oder wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic, bevor Sie die Analyse der Patientenproben fortsetzen.

Verwendung der K-RAS Kontrollplasmid-DNAs

Mit dem Kit werden drei Kontroll-DNAs geliefert:

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2, AN 710141

K-RAS Positive Control Codon 12, AN 710143

K-RAS Positive Control Codon 13, AN 710144

Diese Kontroll-DNAs sind Plasmide mit Insertionen. Die Positivkontrolle enthält zwei Plasmide: eine 50:50 Gemisch aus Wildtyp-Kontrolle und einem Mutationsklon, der in einem Basenpaar vom Wildtyp abweicht. Die Kontrollen werden in getrennten Reagenzgefäßen geliefert, jede in einer Konzentration von 2,5 ng/µL.

Die für die PCR-Amplifikation benötigten Forward- und Reverse-Primer werden im Kit getrennt geliefert. Die Sequenz der Wildtyp- und Positivkontrollen ist weiter unten abgebildet.

Forward-Primer sind **Grün** markiert. Reverse-Primer sind **Rot** markiert. Kodierende Regionen sind **Grau** und die Sequenzunterschiede in der Positivkontrolle sind **Violet** markiert. Großbuchstaben, die nicht markiert sind, sind nichtkodierende cDNA-Bereiche.

K-RAS Control: Wild-Type Exon 2

MD-Loci: 10428 - 10706

Größe: 286 bp

cgggtttgtattaaaagggtactggaggagatttgatagtgattaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacattttcattttt
attataag**GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTA**
GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTTGTGGACGAATATGATC
CAACAATAGAGgtaaatctgttttaatatgcatattactggtgc**aggaccattctttgatacagataaa**cccg

K-RAS Positive Control Codon 12

MD-Loci: 10428 - 10706

Größe: 286 bp

```
cgggtttgtattaaaaggctactggaggattttgatagtgattaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat  
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT[G/A]GTGGCG  
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT  
CCAACAATAGAGgtaaatctgtttaaatgcatattactgtgtaggaccattctttgatacagataaa
```

K-RAS Positive Control Codon 13

MD-Loci: 10428 - 10706

Größe: 286 bp

```
cgggtttgtattaaaaggctactggaggattttgatagtgattaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattat  
attataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTG[G/A]CG  
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT  
CCAACAATAGAGgtaaatctgtttaaatgcatattactgtgtaggaccattctttgatacagataaa
```

Für den Gebrauch dieser Kontrollen halten Sie sich bitte an die Anleitung im Amplifikationsprotokoll (Seite 8), der SURVEYOR Nuclease-Verdau (Seite 11) und Analyse des K-RAS Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease (Seite 14).

ES WIRD PERSONEN, DIE DIESEN TEST ERSTMALS AUSFÜHREN, DRINGEND EMPFOHLEN, ZUNÄCHST TESTS MIT KONTROLLEN DURCHZUFÜHREN, BEVOR SIE GENOMISCHE PROBEN BEARBEITEN.

Interpretation der Ergebnisse

Analyse des K-RAS Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease

Für ein schnelles und einfaches Setup in die Navigator Software kann das K-RAS exon 2 CE Protocol Template für das WAVE HS System heruntergeladen werden. Gehen Sie auf:

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

und folgen Sie den Anleitungen zur Installation der K-RAS-Protokoll- und Verifizierungsverfahren.

1. Für ein manuelles Setup des WAVE HS Systems siehe die Parameter für Gradientenvorhersage in **Anhang B: WAVE HS System-Parameter für das K-RAS Protokoll**.
Hinweis: Es wird empfohlen, dass anstelle eines manuellen Setups das installierte Protokoll zu verwenden.
2. Beachten Sie, dass Sie zu Vergleichs- und Kontrollzwecken den SURVEYOR Nuclease-Verdau immer mit Kontroll- (Wildtyp und Positivkontrollen) und Proben-DNAs durchführen und auf derselben Platte auf dem WAVE System testen.
3. Zusätzlich kann vor der Probenanalyse der WAVE DNA Sizing Standard (AN 560078) getestet werden, um sicherzustellen, dass das WAVE System ordnungsgemäß arbeitet. Ein Blindlauf (0-µL-Injektion) sollte mit dem K-RAS Exon 2 Gradienten vor dem Testlauf durchgeführt werden. Dann mit dem K-RAS Exon 2-Gradienten 8 µL des WAVE DNA Sizing Standard injizieren – siehe **Abbildung 2** für erwartete Ergebnisse.

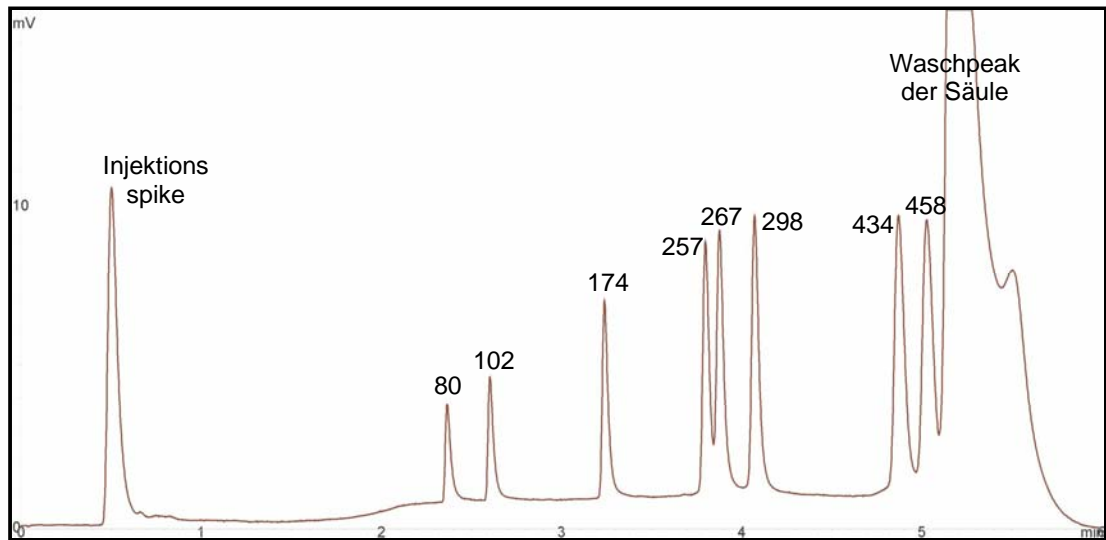


Abbildung 2 Injektion des WAVE DNA Sizing Standard mit dem K-RAS Exon 2-Gradienten (UV-Detektion). Fragmentlängen werden in Basenpaaren angegeben.

Nähere Angaben zu dem Gradienten für K-RAS Exon 2 siehe **Anhang B – Gradient für K-RAS Exon 2**.

Beispielsergebnisse

Beispiele von Ergebnissen mit dem SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* für WAVE HS Systems zeigen die Abbildungen 3 und 4 unten. Für diese Beispiele wurde der in dem Abschnitt Übersicht beschriebene Prozess genau eingehalten.

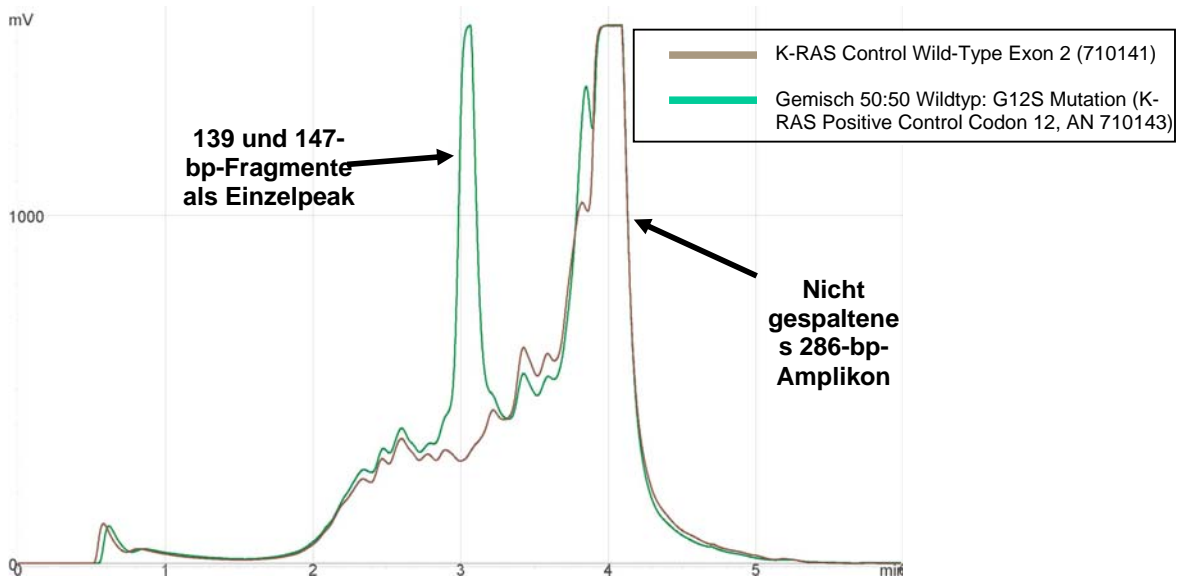


Abbildung 3 zeigt die SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukte von dem 286-bp Exon 2 Codon 12 Amplikon. In dieser PCR wurden als Matrizen die K-RAS-Control verwendet: Wild-Type Exon 2 und K-RAS Control Codon 12. Diese G12S-Mutation erzeugt G-T und C-A Heteroduplices, die nach dem SURVEYOR Nuclease-Verdau ergeben 139- und 147-bp-Fragmente. Die Peaks dieser Fragmente werden durch diesen Gradienten nicht aufgelöst und erscheinen als Einzelpeak. Verdauungsprodukte wurden mit dem WAVE HS System analysiert.

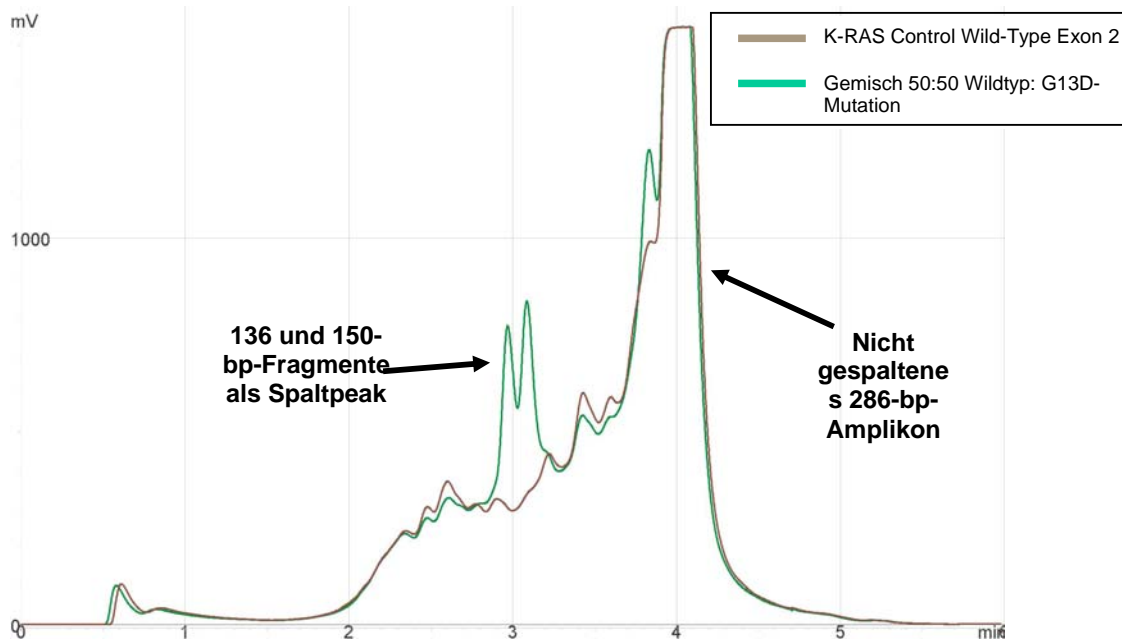


Abbildung 4 zeigt die SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukte des 286-bp Exon 2 Codon 13 Mutationsamplikons, Heteroduplices eluieren als Einzelpeak. In dieser PCR wurden als Matrizen die K-RAS Control verwendet: Wild-Type Exon 2 und K-RAS Positive Control Codon 13. Diese G13D-Mutation erzeugt G-T und C-A Heteroduplices, die nach dem SURVEYOR Nuclease-Verdau 136- und 150-bp-Fragmente ergeben. Die Peaks dieser Fragmente werden getrennt und ergeben einen typischen Doppelpeak. Verdauungsprodukte wurden mit dem WAVE HS System analysiert.

Dieses Kit ist darauf ausgelegt, deutlich charakteristische WAVE System-Signale (Chromatogramme) für Mutationen in Codon 12 und 13 anzuzeigen. Damit erhält der Anwender die Option einer internen Validierungsmöglichkeit, auf den Mutationsstatus einer Probe rückzuschließen, ohne die Notwendigkeit einer Sequenzbestätigung.

Leistungsmerkmale

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

Validierung des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* mit Plasmidklonen der häufigsten K-RAS Exon 2-Mutationen haben gezeigt, dass SURVEYOR Nuclease-Peaks in einem Gemisch aus 1% Mutant und 99% Wildtyp nachgewiesen werden können.

Die nachstehenden Ergebnisse zeigen Chromatogramme des WAVE HS Systems von Verdünnungsreihen für Beispielmutationen in Codon 12 und 13, sowie die Sequenzierungselektropherogramme ausgewählter Verdünnungen.

Verdünnungsreihen zur Nachweisgrenze der K-RAS Exon 2 G12S Mutation

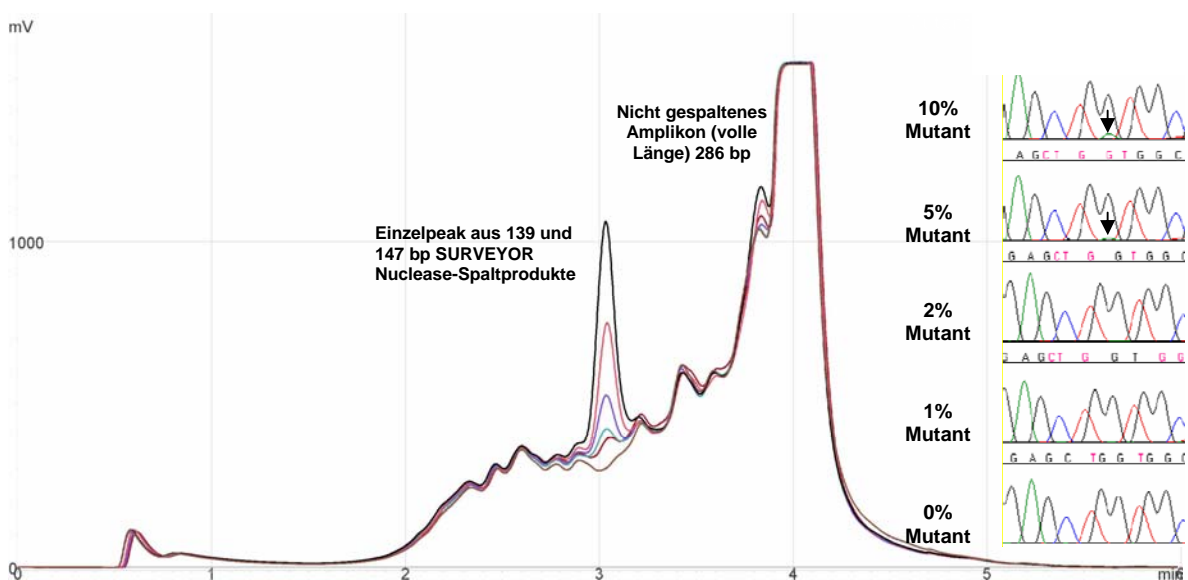
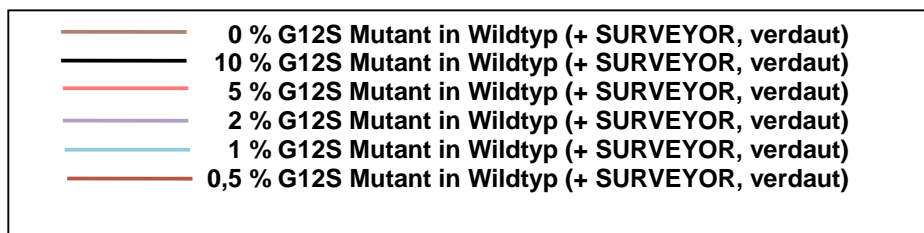


Abbildung 5 SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* Titration der K-RAS Exon 2 G12S-Mutation

Durch Mischen der K-RAS-Control wurden unterschiedliche Mutantenstufen hergestellt: Wild-Type Exon 2 (AN 710141) und K-RAS-Positive Control Codon 12 (AN 710143), dann Erhitzen und Abkühlen des Gemisches zur Bildung von Heteroduplices. Diese Gemische werden dann mit der SURVEYOR Nuclease gespalten und mit dem WAVE 4500 HT HS System analysiert. **Hinweis:** Um 90 % Wildtyp und 10 % Mutant zu erhalten, wird eine Mischung aus 80 % AN 710141 und 20 % AN 710143 (siehe Seite 1) vorbereitet. Da die G12S-Mutation näher der Mitte des Exon 2-Amplikons liegt, haben die SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte sehr ähnliche Retentionszeiten und bilden einen einzelnen Peak. Beachten Sie auch, dass die Mehrzahl der Amplikonmischung aus Wildtyp-Homoduplices besteht, die nicht durch die SURVEYOR Nuclease gespalten wurden. Nachweisgrenze des G12S-Mutantenamplikons beträgt 1 %.

Nachweisgrenze der Sequenzierungsergebnisse für die K-RAS Exon 2 G12S-Mutation

Elektropherogramme zeigen die Sequenzierungsergebnisse für die mit der SURVEYOR Nuclease analysierten PCR-Produkte.

Durch automatische Sequenzierung der Forward- und Reverse-Stränge kann die G12S-Mutation in Gemischen mit einem Wildtypanteil unter 10 % oft nicht nachgewiesen werden. Sequenzergebnisse mit 5% Mutationsanteil in Codon 12 koennen zusammen mit dem Ergebnis des Surveyor-Verdaut mit hoeherer Sicherheit ausgewertet werden.

Verdünnungsreihen zur Nachweisgrenze der K-RAS Exon 2 G13D Mutation

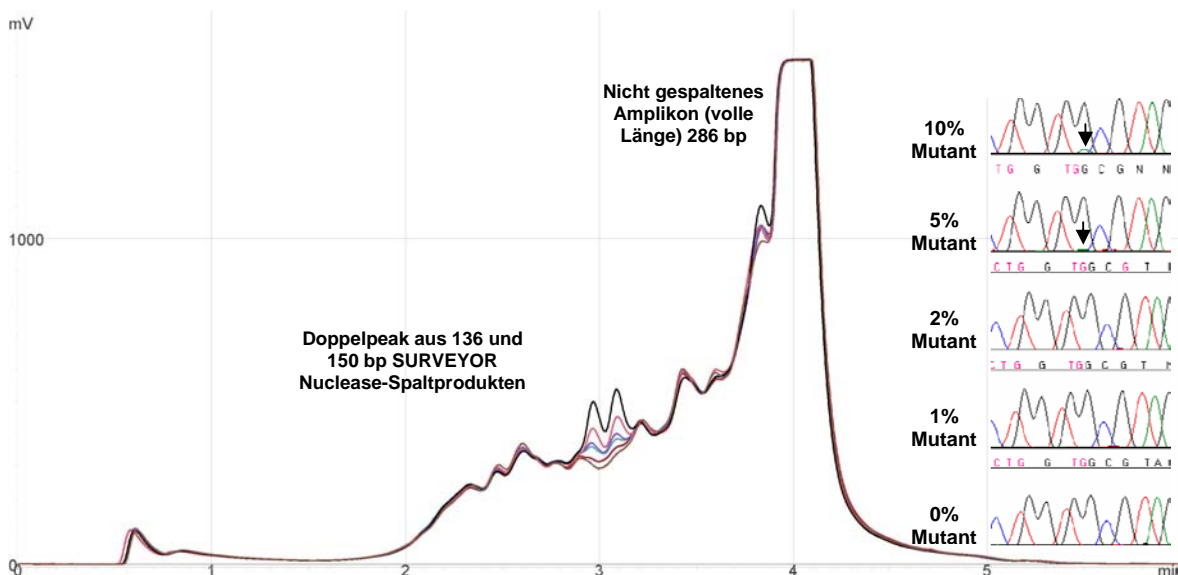
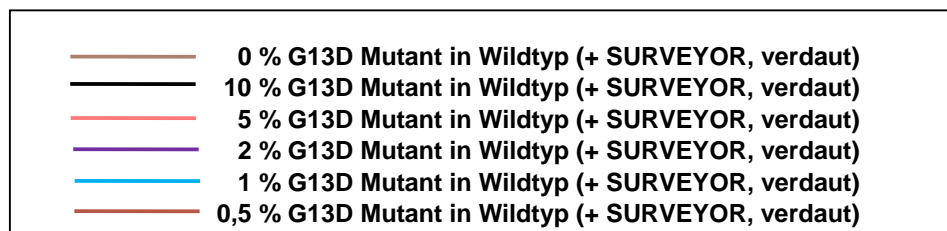


Abbildung 6 SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* Titration der K-RAS Exon 2 G13D-Mutation

Durch Mischen der K-RAS Control wurden unterschiedliche Mutantenstufen hergestellt: Wild-Type Exon 2 (AN 710141) und K-RAS Positive Control Codon 13 (AN 710144), dann Erhitzen und Abkühlen des Gemisches zur Bildung von Heteroduplices. Diese Gemische werden dann mit der SURVEYOR Nuclease gespalten und mit dem WAVE 4500 HT HS System analysiert. **Hinweis:** Um 90 % Wildtyp und 10 % Mutant zu erhalten, wird eine Mischung aus 80 % AN 710141 und 20 % AN 710144 (siehe Seite 10) vorbereitet. Da die G13D-Mutation etwas weiter als die G12S-Mutation von der Mitte des Exon-2-Amplikons entfernt ist (siehe Abbildung 5), besitzen die beiden SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte verschiedene Retentionszeiten und bilden einen Doppelpeak. Beachten Sie, dass der größte Teil der Amplikonmischung aus Wildtyp-Homoduplices besteht, die nicht durch die SURVEYOR Nuclease gespalten werden. Nachweisgrenze des G13D-Mutantenamplikon beträgt 1 %.

Nachweisgrenze der Sequenzierungsergebnisse für die K-RAS Exon 2 G13D Mutation

Zum Vergleich werden Elektropherogramme mit den Sequenzierungsergebnissen der PCR-Produkte unterschiedlicher Mutantenstufen angezeigt. Automatische Sequenzzuordnung der Forward und Reverse-Stränge kann die G13D-Mutation in Gemischen mit Wildtyp unter 10 % oft nicht nachweisen. Zusammen mit den SURVEYOR Nuclease-Ergebnissen ist es möglich, die 90:10 Wildtyp:Mutant (5 % Mutation) Sequenzierungselektropherogramme für Codon 13 hinsichtlich vorhandener Mutationen mit mehr Sicherheit zu interpretieren.

Interpretation von Proben mit Mutationen geringer Prozentzahl

Wenngleich interne wie externe Validierungsuntersuchungen des SURVEYOR Scan K-RAS Kits gezeigt haben, dass ein Nachweis von Mutationen bei 1 % Wildtyp realistisch ist, hängt das von der Qualität der Basislinie eines bestimmten Chromatograms ab. Genomische DNA- oder PCR-

Reaktionen, unzureichende Waschverfahren der DNASep Cartridge (siehe Waschverfahren Seite 32) oder ein suboptimales Setup des WAVE Systems können alle zu einer unregelmäßigen Basislinie (Hintergrundrauschen) führen, die es schwieriger gestaltet, kleinere Peaks von der Basislinie zu unterscheiden.

Die Chromatogramme unten (Abbildung 7 und 8) zeigen die expandierten Regionen von Analysen mit niedrig konzentrierten Mutationen und negativen Kontroll-Basislinien.

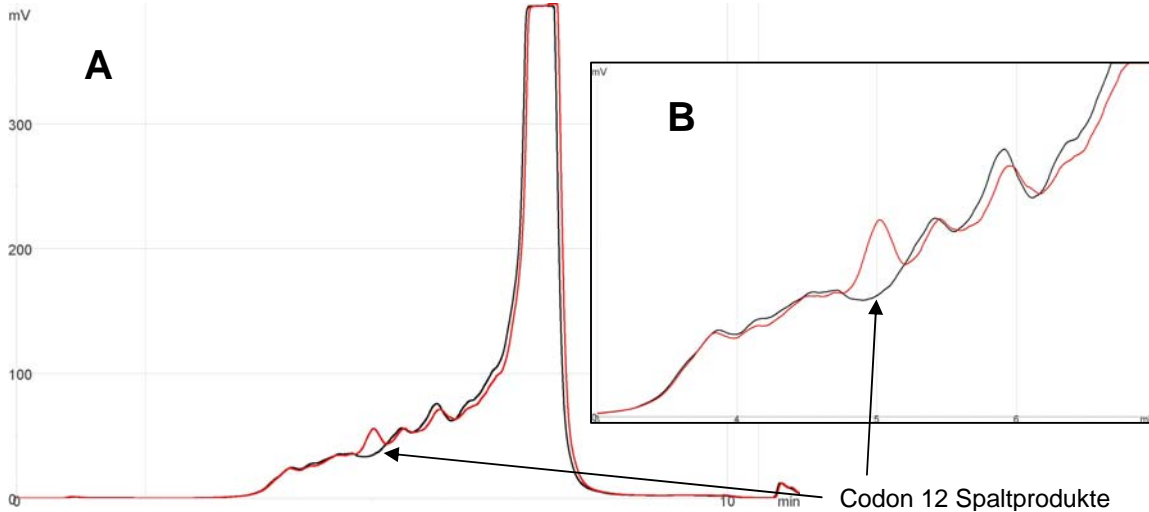


Abbildung 7 Nachweis geringgradiger Codon 12-Mutationen Rote Linie = Probe mit wenig Codon 12-Mutation. Schwarze Linie ist die Wildtypkontrolle. Abbildung 7B ist ein vergrößerter Bereich der Region, der die SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte zeigt. Beachten Sie, dass das Basislinienrauschen mit ähnlichen Amplitudenpeaks wie die Peaks der Spaltfragmente zwischen den Test- und Kontrollproben gleichbleibend ist.

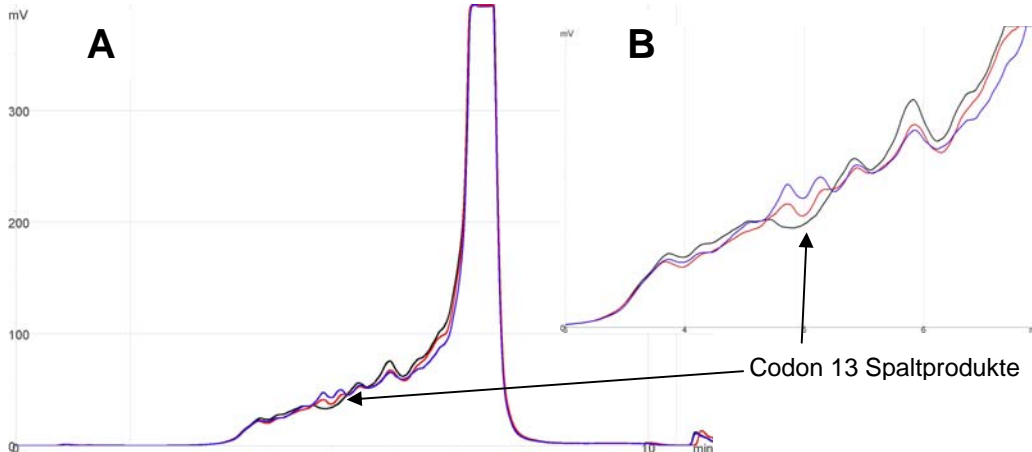


Abbildung 8 Nachweis geringgradiger Codon 13-Mutationen Rote und blaue Linien bedeuten Proben mit wenigen Codon 13-Mutationen. Schwarze Linie ist die Wildtypkontrolle. Abbildung 8B ist ein vergrößerter Bereich der Region, der die SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte zeigt. Beachten Sie, dass das Hintergrundrauschen mit ähnlichen Amplitudenpeaks wie die Peaks der Spaltfragmente zwischen den Test- und Kontrollproben gleichbleibend ist.

Es wird empfohlen, im Falle eines Zweifels über die An- oder Abwesenheit von SURVEYOR Nuclease-Verdauungspeaks die Probenanalyse mit derselben genomischen DNA-Matrize der Probe zu wiederholen. Falls die Anwesenheit von Peaks auch weiterhin nur vermutet werden kann bzw. unbestimmt ist, sollte die genomische DNA frisch isoliert und erneut getestet werden. Empfehlungen, um die Signal-Rausch-Abstände zu verstärken, sind unter anderem:

- FFPE-Präparate mit einer hohen Konzentration an Tumorzellen auswählen.
- Mikrodissektion, um den Anteil an Tumorzellen zu normalen Zellen zu erhöhen.

- Überprüfen, ob die genomische DNA den in **Überlegungen zu den Matrizen** auf Seite 7 beschriebenen Reinheitskriterien genügt.

Niedriger Prozentsatz an Mutationsbelastung macht eine Bestätigung durch DNA-Sequenzierung ebenfalls schwierig.

Verfahrensbeschränkungen

Von der Extraktion der formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben übertragene Kontaminierungsstoffe können ebenfalls die PCR-Amplifikations- und SURVEYOR Nuclease-Verdauungsvorgänge stören. Die in der Qualitätskontrolle der PCR-Produkte auf Seite 11 beschriebenen Verfahren zur Qualitätskontrolle gewährleisten, dass die extrahierte DNA zur Verwendung mit diesem Kit geeignet ist.

Dieses Kit wurde für die Verwendung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Biopsieproben von Kolorektaltumoren validiert. Eine Validierung für eine Verwendung mit anderen Krebsarten oder frischen bzw. tiefgefrorenen Biopsieproben besteht nicht.

Zur Fehlersuche nicht standardmäßiger Ergebnisse und Einzelheiten zu Faktoren, die diesen Test beeinträchtigen können, siehe Fehlersuche im Anhang A weiter unten.

Bei diesem Kit muss besonders darauf geachtet werden, Übertragung und Kreuzkontamination zu vermeiden. Die hohe Empfindlichkeit der Testmethode erfordert Vorsichtsmaßnahmen für folgende Punkte:

- Achten Sie darauf, dass alle Proben so gehandhabt werden, dass eine Kreuzkontamination zwischen ihnen nicht vorkommen kann.
- Achten Sie darauf, dass bei allen Testschritten die Plasmidkontrollen des Kits von den Testproben getrennt gehandhabt werden.
- Achten Sie darauf, dass es beim Pipettieren in die 96-well Platten durch Verspritzen während des Mischens oder durch nicht gewechselte Pipettenspitzen nicht zu einer Kontamination der Proben mit angrenzenden Wells kommt.

Literaturnachweis

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. **SET-negative undifferentiated endometrial sarcoma with the amplified epidermal growth factor receptor gene showing a temporary response to Imatinib mesylate.** Mitsunashi 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, Rodríguez 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 SET 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).

Anhang A

Fehlersuche

Ein effektiver Einsatz des SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* hängt von der erfolgreichen Ausführung einer Anzahl von Schritten ab. Einer der entscheidenden ist die PCR-Amplifikation, die zur Produktion einer ausreichenden Menge spezifischer, gleichmäßig langer DNA führen muss, um nach der Hybridisierung und Spaltung nachgewiesen zu werden. Das wiederum hängt von der Qualität der Ausgangsprobe ab. Die Durchführung dieses Tests mit DNA, die nicht den Qualitäts- und Quantitätskriterien entspricht, ist nicht empfehlenswert.

Hinweis: Wenn Sie zum ersten Mal mit SURVEYOR Nuclease arbeiten, führen Sie die Untersuchungen im Abschnitt **Verwenden der K-RAS Kontrollplasmid-DNAs** (Seite 13) durch, nachdem Sie den Abschnitt Schritt-für-Schritt-Anleitung (Seite 7) gelesen und verinnerlicht haben. Bevor Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic wenden, warten Sie bitte die Ergebnisse für die K-RAS Kontrollplasmid-DNAs ab.

Diese Fehlersuche deckt eine Liste an Problemen ab, die bei der Arbeit mit dem SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit *CE IVD* auftreten können, sowie Vorschläge, wie sie zu lösen sind.

Problem 1 – Niedrige PCR-Ausbeute oder kein PCR-Produkt

MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
Schlechte Qualität der DNA-Matrize	Wiederholen Sie die Aufreinigung der DNA. Überprüfen Sie die verwendete Aufreinigungsmethode.
Thermocycler nicht kalibriert.	Überprüfen Sie die Kalibrierung des Thermocyclers.
Nicht ausreichende Matrize.	Erhöhen Sie die Matrizenmenge.

Hinweis: Es sollte hochwertige DNA aus FFPE verwendet werden. Die DNA sollte eine durch Absorption bei 260 nm gemessene Konzentration von 25 ng/μL aufweisen sowie ein Absorptionsverhältnis von 260:280 nm von >1,8 haben und >90 % DNA sein (d.h. nahezu frei von tRNA- und rRNA-Kontamination laut Agarosegeleauswertung). DNA-Proben bei -20 °C aufbewahren.

Die Analyse von DNA-Matrize, die aus paraffineingebettetem Gewebe extrahiert wurde, erfordert mehrere Vorsichtsmaßnahmen. Die extrahierte DNA kann mit Uracil-DNA-Glykosylase behandelt werden, um eine Amplifikation von DNA-Fragmenten zu vermeiden, die deaminierte C-Reste enthalten. Häufig wird ein hoher Prozentsatz des aus dem paraffineingebetteten Gewebe extrahierten A₂₆₀ Adsorptionsmittels bei der PCR nicht gut amplifiziert. Oft hilft eine größere Menge Start-DNA, um ein geeignetes Amplifikationsprodukt zu erhalten.

Problem 2 – Mehrere PCR-Produkte

MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
Anlagerungstemperatur zu niedrig.	Überprüfen Sie die Kalibrierung des Thermocyclers.

Hinweis: PCR sollte einen ausreichend hohen Ertrag (>20 ng/μL) einer **EINZELNEN** amplifizierten Spezies der richtigen Länge erzeugen. **Für die PCR muss die in diesem Kit mitgelieferte DNA-Polymerase und der DNA Polymerase 10X PCR Buffer verwendet werden.** Amplikons aus Kontrollen müssen mit der SURVEYOR Nuclease verdaut und analysiert werden, um durch Sichtprüfung der Chromatogrammprofile störendes Hintergrundrauschen auszuschließen (siehe **Ergebnisbeispiele** Seite 14-15, Abbildungen 3-4). Kontrollieren Sie vor dem Verdau jedes amplifizierte DNA-Produkt durch Gelelektrophorese oder WAVE-HPLC, um sicherzugehen, dass es eine einzelne Spezies der erwarteten Länge ist.

Problem 3 – Keine Spaltprodukte bei der Analyse nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung der Heteroduplices

MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
Anteil an Mismatch-Ziel zu gering.	Test anhand der Kontrollen überprüfen.
Ineffiziente Bildung von Heteroduplices.	Führen Sie das Hybridisierungsverfahren genau nach Anleitung durch. Verwenden Sie bei den SURVEYOR Nuclease-Verdauungen frisch hybridisierte DNA.
Inaktive SURVEYOR Nuclease	Führen Sie eine Reaktion mit Kontrollen durch, um die Enzymleistung zu verifizieren.

Hinweis: SURVEYOR Nuclease spaltet überwiegend Mismatches in Heteroduplices. Das Verhältnis von Heteroduplex zu Homoduplex in der hybridisierten Probe bestimmt das Verdauungssignal der SURVEYOR Nuclease. Wenn die K-RAS-Mutation in einer sehr geringen Konzentration in der genomischen DNA-Probe vorliegt, kann das Signal für ein positives Ergebnis zu niedrig sein.

Es ist wichtig, darauf zu achten, dass der Hybridisierungsschritt im Thermocycler-Programm enthalten ist (siehe **Amplifikationsprotokoll** Seite 8), um die Leistung der Heteroduplex-Bildung zu optimieren. Heteroduplices werden bei Standard-PCR-Reaktionen mit sehr geringem Ertrag gebildet.

Hinweis: Der Signal-Rausch-Abstand ist im Allgemeinen hoch genug, um Mutationen mit einem geringen Prozentsatz der Gesamt-DNA-Matrize nachzuweisen. Es ist möglich, 1 bis 2% mutante DNA zu detektieren. Abbildungen 5 und 6 (Seite 16-17) zeigen die Detektion der Mutationen K-RAS Exon 2 Codon 12 und 13 (2-18% Heteroduplex) mit einem WAVE HS System. Abbildungen 3-4 (Seite 14-15) zeigen die mit Homoduplex und Heteroduplex K-RAS Positivkontroll-DNAs (in diesem Kit enthalten) generierten Verdauungsprodukte auf einem WAVE HS System. Die mutationsspezifischen Spaltprodukte sind deutlich als zwei neue Peaks zu erkennen, die mit den erwarteten Längen eluiert wurden, die anhand des DNA-Längenstandards berechnet werden können.

Achtung: Kommerziell erhältliche PCR-Puffer variieren extrem ihrer Zusammensetzung und die Zubereitungen werden durch den Hersteller oft nicht genau bezeichnet. Mehrere Puffer sind aufgrund von pH oder Zusatzstoffen, Tensiden oder anderen herstellereigenen Inhaltsstoffen mit der SURVEYOR Nuclease **NICHT** kompatibel. **Verwenden Sie KEINE andere als die im Kit enthaltene(n) Polymerase oder 10x Polymerase-Puffer.**

Problem 4 – Hohes Hintergrundrauschen nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung

MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
Suboptimaler Hybridisierungsschritt	Gehen Sie wie folgt vor: <ol style="list-style-type: none"> 1. Achten Sie darauf, dass sich die DNA-Konzentration in Bereich von >25 ng/µL befindet. 2. Wiederholen Sie den Hybridisierungsschritt, wobei Sie Hybridisierungsverfahren genau nach Anleitung durchführen.
DNA-Menge zu niedrig.	Überprüfen Sie Ertrag und Qualität der Matrizen-DNA.
Unspezifische PCR-Produkte.	Überprüfen Sie Ertrag und Qualität der Matrizen-DNA.
SURVEYOR Enhancer W2 und/oder SURVEYOR Enhancer Cofactor sind nicht mehr aktiv.	Überprüfen Sie das Verfallsdatum des Kits.

Hinweis: Die SURVEYOR Nuclease schneidet gelegentlich bei doppelsträngigen DNA wahllos "matched" Genorte ein, was nach dem Verdau ein Hintergrundrauschen erzeugt¹⁸. Diese Aktivität wird durch den SURVEYOR Enhancer W2 und seinem Kofaktor unterdrückt, ohne ansonsten die

Mismatch-Spaltreaktion negativ zu beeinträchtigen. SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Enhancer Cofactor sind in diesem Kit enthalten und sollten immer verwendet werden.

Wenn das immer noch der Fall ist und kleine Peaks hervorruft, wird das durch Vergleich des Kontrollverdaus von Homoduplices mit dem Probenverdaus von der Navigator Software erkannt und normalisiert.

Problem 5 – Peaks des SURVEYOR Nuclease-Verdaus bei Negativkontrollen

MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
Kontamination des Kitinhalts mit K-RAS-Amplikons oder Plasmidkontrollen.	Entsorgen Sie alle Kitkomponenten und verwenden ein neues Kit. Wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic, um mögliche Ursachen und Kontaminationsquellen zu besprechen.

Problem 6 – Spitzen der SURVEYOR Nuclease-Verdauungspeaks auf WAVE HSD- Fluoreszenzspur abgeschnitten

MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
Der hoch empfindliche Detektor besitzt einen internen Feedback-Algorithmus, der die Menge Licht, die durch die Durchflussszelle geht, kontrolliert. Je mehr Licht durch die Durchflussszelle geht, um so niedriger ist der Cut-off-Wert (mV) des Detektors, doch umso höher die Empfindlichkeit.	Ändern der Emissionswellenlänge würde das Problem lösen, allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit. Es wird empfohlen, auf die chromatografische Spur des UV-Detektors zu wechseln. Wenn die Fluoreszenzdetektor-Peaks im Chromatogramm abgeschnitten sind, gibt Ihnen die UV-Spur ein deutlich lesbares Signal. Siehe Beispiele in Abbildung 9a und 9b unten. Alternativ kann ein geringeres Probenvolumen neu injiziert und die Fluoreszenzsignalintensität herabgesetzt werden.



Abbildungen 9a und 9b Wenn mit dem HSD Fluorescent Detector abgeschnittene Peaks erhalten werden, kann der UV Detector-Ausgang auch zur Probenanalyse verwendet werden.

Die oben dargestellten Chromatogramme zeigen sowohl für den Fluoreszenz- (9a) als auch den UV-Detektor (9b) dieselben Ergebnisse fuer die genomischen Proben. In jeder Abbildung ist die rote Linie die G12V-Mutationsprobe, die schwarze Linie eine Wildtyp-Referenzprobe. Die mit dem Fluoreszenzdetektorausgang geladene und analysierte große Menge DNA in Abbildung 9a führt zu abgeschnittenen Peaks für die Homoduplex- sowie den SURVEYOR Nuclease-Verdaus. Die entsprechenden UV-Detektorsignale zeigen die Peaks des SURVEYOR Nuclease-Verdaus genauso deutlich wie die nicht geschnittenen Homoduplex-Peaks.

Anhang B

WAVE System **INBETRIEBNAHME/ Säulenkalibrierung (Navigator Software) für SURVEYOR Nuclease-Anwendungen**

1. Nur WAVE Optimized buffers verwenden.
2. Buffers A und B zusammen mit Solution D durchspülen.
3. Die Injektionsspritze ansaugen lassen (Frontdisplay des Autosamplers bei dem 3500, durch die Software bei dem 4500).
4. Die HSD-Pumpe ansaugen lassen.
5. Wählen Sie unter Setup (Installation) in der Dropdown-Menüleiste [Module Setup] (Modulinstallation).
6. Markieren Sie das Kontrollkästchen UV Detector unter [Instrument] (Gerät).
7. Prüfen Sie, ob die Detektorwellenlänge auf 260 nm eingestellt ist.
8. Markieren Sie das Kontrollkästchen Fluorescence Detector unter [Instrument] (Gerät).
9. Prüfen Sie, ob die Anregungswellenlänge des Detektors auf 492 nm und die Emissionswellenlänge auf 526 nm eingestellt ist (HS Staining Solution I).
10. Erstellen Sie im Dropdown-Menü der Navigator Software bei Bedarf ein neues Projekt oder öffnen Sie ein bestehendes Projekt.
11. Falls ein neues Projekt erstellt wurde, muss ein neues Sample tray angelegt werden (achten Sie darauf, dass der richtige Plattentyp gewählt wird).
12. Erstellen Sie mit dem Universal Linear Application Type zwei leere Injektionen.
 - a. Klicken Sie auf der Speed Plate mit der linken Maustaste auf Vial 96, um das Vial zu markieren (unter der Voraussetzung, dass ein 96-well Tray Type verwendet wird).
 - b. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf Vial, um die Injection Page zu öffnen.
 - c. Ändern Sie den Application Type auf "universal linear".
 - d. Ändern Sie die Reinigungsoption auf "fast clean" (falls zutreffend) oder "active clean".
 - e. Überprüfen Sie, ob die Ofentemperatur in der Methode 50,0 °C beträgt.
 - f. Ändern Sie das Volumen auf 0 µL.
 - g. Ändern Sie die Anzahl der Injektionen auf 2.
 - h. Klicken Sie mit der linken Maustaste auf die Schaltfläche [Generate] (Generieren) unten links.
13. Injektionen durchführen.
14. Erstellen Sie drei 5-µL-Injektionen mit dem WAVE DNA Sizing Standard (Transgenomic AN 560078) mit dem universalen linearen Anwendungstyp.
 - a. Setzen Sie eine Probe des WAVE DNA Sizing Standard in ein 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäß in Position 96.
 - b. Klicken Sie auf dem Plattenlayout mit der linken Maustaste auf Vial 96, um das Vial zu markieren (unter der Voraussetzung, dass ein 96-well Tray Type verwendet wird).
 - c. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf Vial, um die Injection Page zu öffnen.
 - d. Ändern Sie den Application Type auf "universal linear".
 - e. Ändern Sie die Cleaning Option auf "fast clean" (falls zutreffend) oder "active clean".
 - f. Überprüfen Sie, ob die Ofentemperatur in der Methode 50,0 °C beträgt.
 - g. Ändern Sie das Volumen auf 5 µL.

- h. Ändern Sie die Anzahl der Injektionen auf 3.
 - i. Klicken Sie mit der linken Maustaste auf die Schaltfläche [Generate] (Generieren) unten links.
15. Injektionen durchführen.
16. Nach Beenden der Testläufe die Chromatogramme anzeigen, um die Stabilität der Retentionszeit der 80- und 587-bp-Peaks zu gewährleisten.
- a. Die Retentionszeit der 80-bp und des 587-bp-Peak des WAVE DNA Sizing Standard sollte von Lauf zu Lauf innerhalb von 0,1 min sein.
17. Führen Sie die Säulenkalibrierung durch, bevor Sie richtige Proben bearbeiten.
- a. Klicken Sie im Register Analysis (Analyse) auf die Schaltfläche [Select Results] (Ergebnisse wählen).
 - b. Suchen Sie die dritte Injektion des WAVE DNA Sizing Standard. Öffnen Sie mit der Dateinavigation links Projekt und Platte und suchen dann mit der Injection-Anzeige rechts die Injektion.
 - c. Markieren Sie die dritte Injektion WAVE DNA Sizing Standard und klicken dann auf die Schaltfläche [Add Selected Results] (Ausgewählte Ergebnisse hinzufügen).
 - d. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Chromatogramm.
 - e. Wählen Sie [Chart] (Grafik).
 - f. Aktivieren Sie in der Option Peak Labels (Peak-Bezeichnungen) das Kontrollkästchen Peak Labels und wählen Sie aus dem Dropdown-Menü [Peak Retention Time] (Peak Retentionszeit).
 - g. Klicken Sie auf [Apply] (Anwenden).
 - h. Klicken Sie auf [OK].
 - i. Wählen Sie aus dem Dropdown-Menü Setup (Installation) in der Menüleiste [Cartridge Calibration] (Säulenkalibrierung).
 - j. Geben Sie die Retentionszeitwerte ein, die für den entsprechenden Peak des WAVE DNA Sizing Standard auf dem Chromatogramm angezeigt werden.
 - k. Wählen Sie [Plot New Calibration] (Neue Kalibrierung auftragen).
 - l. Wählen Sie [Accept New Calibration] (Neue Kalibrierung akzeptieren).

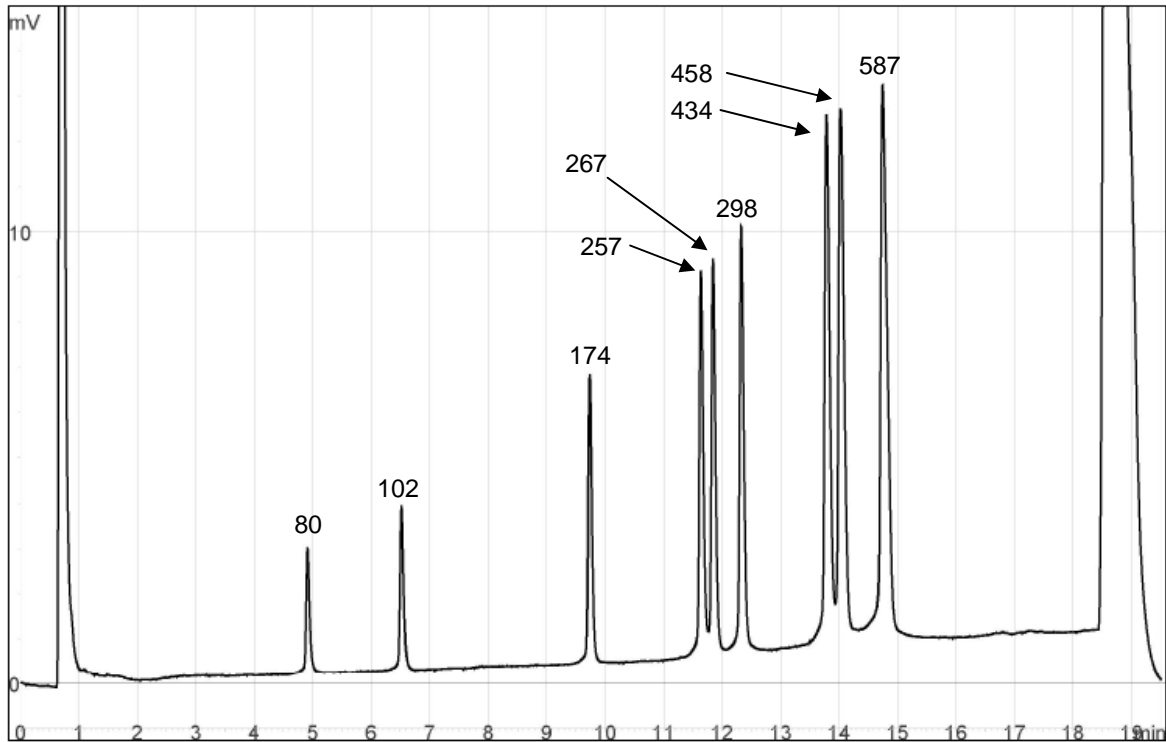


Abbildung 10 Typische WAVE DNA Sizing Standard-Analyse mit dem Universal Linear Method Type der Navigator Software (Beispiel für WAVE 4500 HT HS).

WAVE HS System-Parameter für das K-RAS Protokoll

Es wird empfohlen, für die Installation in die Navigator Software die K-RAS Exon 2 CE Protocol Template herunterzuladen. Siehe K-RAS Installation Guide unter:

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

Für eine manuelle Installation des WAVE HS System oder zur Überprüfung auf ordnungsgemäße Installation der K-RAS Exon 2 CE Protocol Template siehe folgende Parameter für die Gradientenvoraussage:

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

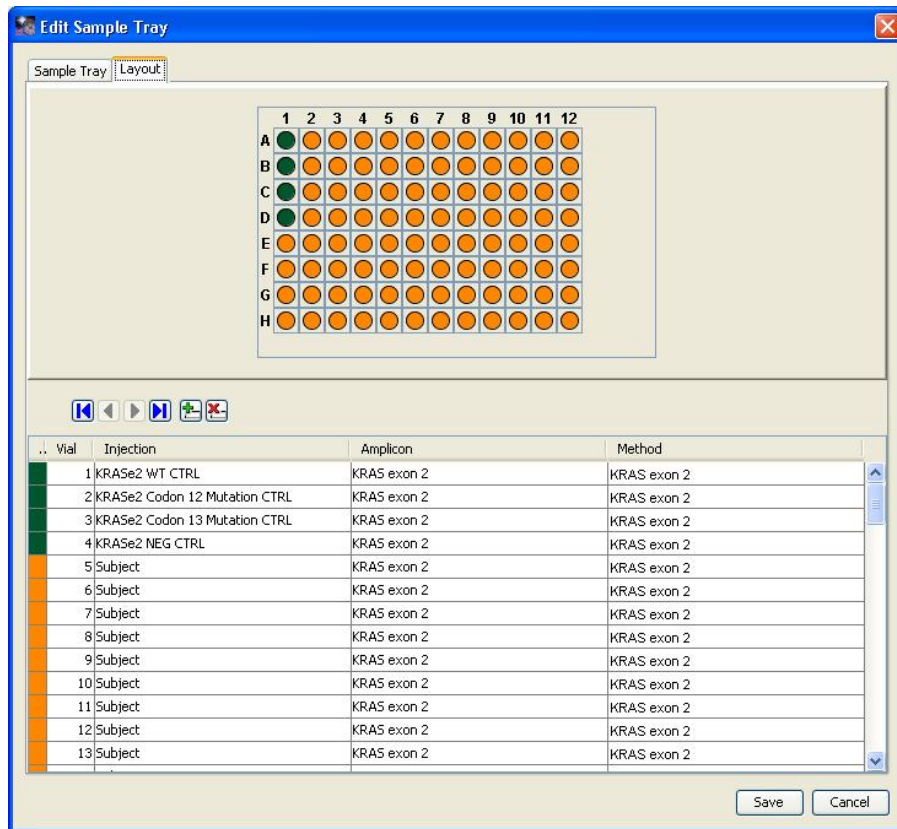


Abbildung 11 Screenshot des Plattenaufbaus, 92 Proben plus Kontrollen

Die K-RAS exon 2 CE Protocol Template befüllt die Injektionstabelle, wie oben dargestellt, mit Daten. Insgesamt können auf einer einzigen Platte 92 Exon 2-Proben (orangefarbene Wells) getestet werden. Zusätzlich laufen je Platte drei Kontrollen für Exon 2 (grüne Wells) und eine Negativkontrolle mit.

Beachten Sie, dass die Injektionstabelle in Spaltenformat aufgebaut ist.

- Die K-RAS Control: Wild-Type Exon 2 ist in Gefäß 1 (A1 auf der Injektionstabelle).
- Die K-RAS Positive Control Codon 12 ist in Gefäß 2 (B1 auf der Injektionstabelle).
- Die K-RAS Positive Control Codon 13 ist in Gefäß 3 (C1 auf der Injektionstabelle).
- Die Negativkontrolle (ohne DNA) ist in Gefäß 4 (D1 auf der Injektionstabelle).

1. Zum Erstellen eines neuen Protokolls gehen Sie auf der Dropdown-Menüleiste auf [File] (Datei), wählen [Protocol] (Protokoll) und dann [Template] (Vorlage).

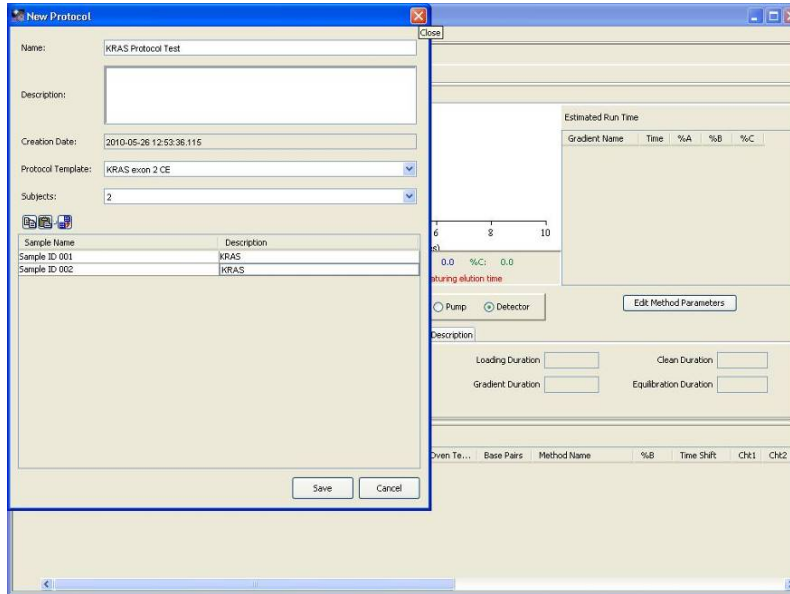


Abbildung 12 Anlage eines neuen Protokolls

- a) Benennen Sie das Protokoll.
 - b) Achten Sie darauf, dass das Protocol Template (Protokollvorlage) "KRAS Exon 2 CE" ist.
 - c) Geben Sie die Anzahl Subjects/Samples (Patienten/Proben) ein, die getestet werden sollen.
 - d) Geben Sie für jede Probe eindeutige Sample Names (Probennamen) ein und wählen [Save] (Speichern).
2. Um eine Injektionstabelle zu erstellen, wählen Sie einen neuen Tray Type (Plattentyp).
- a) Geben Sie den Tray Name (Plattennamen) ein.
 - b) Wählen Sie den Try Type (Plattentyp). Der Tray Type (Plattentyp) muss in Spaltenformat sein. Falls keine Platte verfügbar ist, zur Fehlersuche im Navigator Manual nachschlagen.
 - c) Wählen Sie die K-RAS Kit Tray Template (K-RAS Kit-Plattenvorlage) und dann [OK].

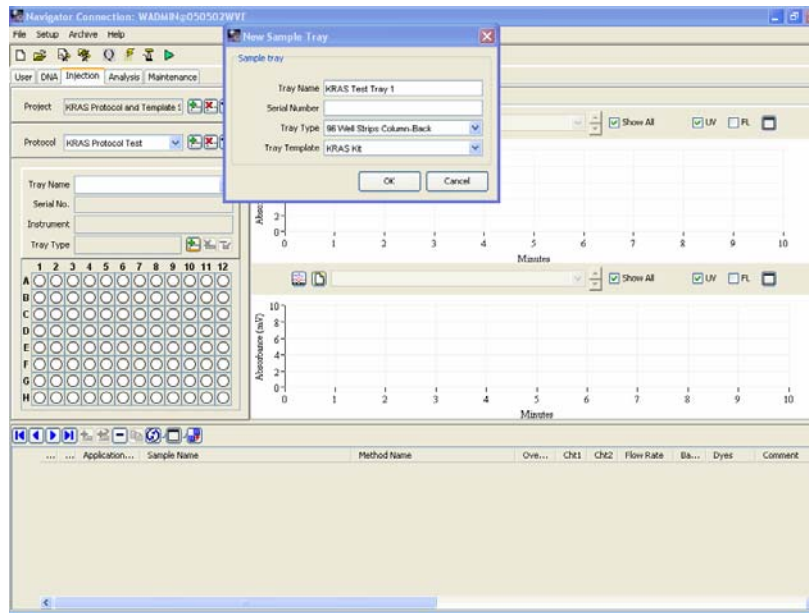


Abbildung 13 Ein neues Sample tray erstellen

Die Plattentabelle wird dann mit Daten befüllt.

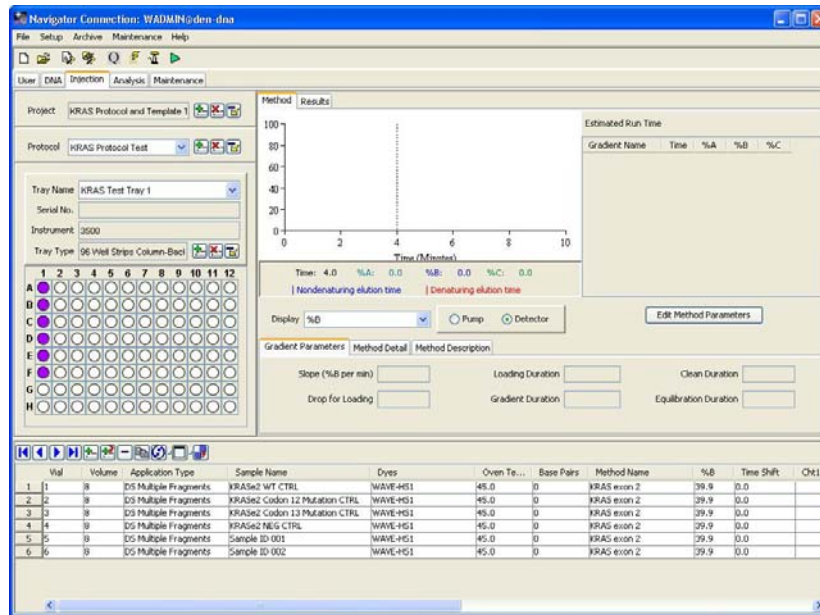


Abbildung 14 A Mit Daten befülltes Sample tray

3. Der Screenshot oben zeigt eine mit Daten befüllte Injektionstabelle mit der K-RAS Exon 2 CE Template zur Analyse von zwei Proben.
4. Probe 1 auf K-RAS Exon 2 muss in Position E1 (Gefäß 5) gestellt werden.
5. Um die HSD-Pumpe auf Betriebsdruck zu bringen sowie das System abzugleichen, muss vor der Probenanalyse eine Leerinjektion durchgeführt werden. Dafür:
 - a) Wählen Sie unter [Setup] (Installation) in der Dropdown-Menüleiste [Project Defaults] (Projektstandards).
 - b) Aktivieren Sie das Kontrollkästchen [Run] (Lauf) unter [Equilibrate Cartridge] (Säule equilibrieren). Eine Leerinjektion ist ausreichend.

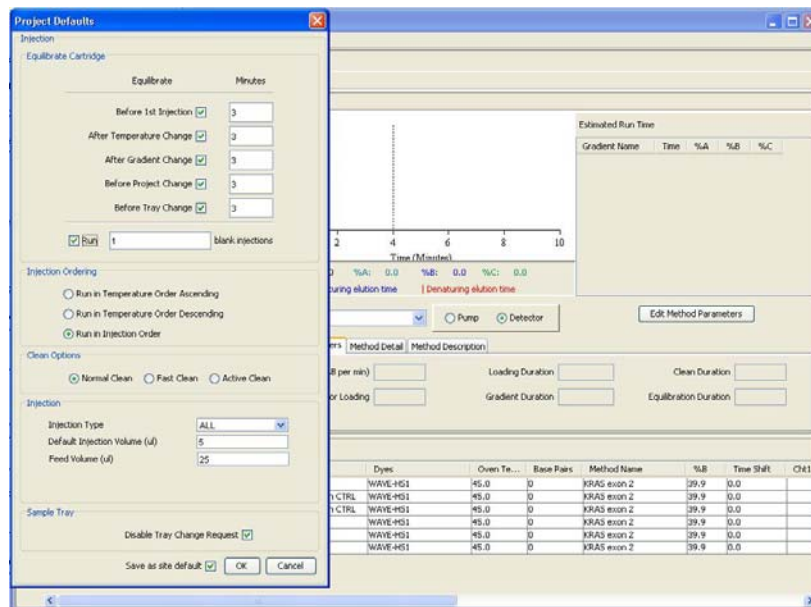


Abbildung 15 Eine Leerinjektion durchführen

6. Gefäß 96 (Position H12) kann für den WAVE DNA Sizing Standard verwendet werden. Die Funktion Navigator Software Protocol kann zum Erstellen von Injektionen für den Längenstandard mit jedem der zur K-RAS-Analyse verwendeten Gradienten verwendet werden. Dafür zwei Zeilen der Injektionstabelle, die die K-RAS Exon 2 CE-Methode verwendet, kopieren. Ändern Sie den Sample Name (Probenamen) in Sizing Standard.
7. Markieren Sie die beiden Probenzeilen mit dem Längenstandard und führen die beiden gewählten Injektionen aus. Betätigen Sie die Schaltfläche erneut, um den Rest der Proben durchzuführen (alle Injektionen auf der Platte). Vor den Längenstandards wird eine Leerinjektion ausgeführt.

Gradient für K-RAS Exon 2

(maximale Fragmentlänge = 400 bp)

Schritt	Zeit	%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

Wartung der DNASep HT Cartridges

Waschverfahren

Die empfohlenen Reinigungsoptionen, wenn SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukte auf die DNASep HT Cartridges eines WAVE System injiziert werden, sind entweder ACTIVE CLEAN oder FAST CLEAN. **Ein normaler Reinigungsvorgang reicht nicht aus.**

Beachten Sie Folgendes:

- Jeweils nach 100 Injektionen von SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukten muss ein HOT WASH durchgeführt werden. Zum Durchführen eines HOT WASH für 15 Minuten bei 80 °C 100 % Solution D (75 % (v/v) ACN) pumpen, gefolgt von einer Systemspülung mit einem Gemisch aus WAVE Optimized Buffers A und B im Verhältnis 1:1 für 30 Minuten. Dieser HOT WASH muss auch nach jeder Testlaufserie mit SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukten durchgeführt werden, unabhängig davon, ob 100 Injektionen durchgeführt wurden (beispielsweise, wenn vorübergehend die Säule nicht verwendet wird oder eine andere DHPLC-Analyse durchgeführt werden soll).
- Der In-line-Filter muss nach 500 Injektionen von SURVEYOR Nuclease-Verdauungsprodukten gewechselt werden. Der In-line-Filter muss ebenfalls gewechselt werden, wenn der Druck zu stark ansteigt (>1500 PSI für DNASep HT Cartridges).
- Alle 500 Injektionen muss ein REVERSE HOT WASH durchgeführt werden. Siehe **Durchführung eines REVERSE HOT WASH an einer DNASep HT Cartridge** im Abschnitt unten.

WARNUNG! Nichteinhalten dieser Verfahren führt zu einem hohen Säulendruck und verschlechterter Säulenleistung.

Durchführung eines REVERSE HOT WASH an einer DNASep HT Cartridge

Um einen REVERSE HOT WASH durchzuführen:

1. Entfernen Sie die DNASep HT Cartridge und setzen Sie sie in umgekehrter Richtung wieder ein.
2. Entfernen Sie den In-line-Filter und ersetzen ihn während des REVERSE HOT WASH durch ein Verbindungsstück.
3. Pumpen Sie für 30 Minuten bei 80 °C 100% Solution D (75 % (v/v) ACN) durch das System mit einer Durchflussrate von 0,9 mL/min.
4. Pumpen Sie ein Gemisch aus WAVE Optimized Buffers A und B im Verhältnis 1:1 für 1 Stunde bei 80 °C durch das System mit einer Durchflussrate von 0,9 mL/min.
5. Entfernen Sie das Verbindungsstück und setzen Sie einen neuen In-line-Filter ein.

Der REVERSE HOT WASH muss ohne In-line-Filter durchgeführt werden. Setzen Sie nach dem REVERSE HOT WASH einen neuen In-line-Filter ein und verwenden die Säule für die nächsten 500 Injektionen in umgekehrter Richtung.

Kontakt

Firmensitz

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

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

E-Mail: SURVEYORscan@transgenomic.com

Europa

Handelsbevollmächtigter für die 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

*Nur in Nordamerika

ISO 9001:2008 Zertifizierung

Transgenomic Inc. verfügt über ein durch die BSI zertifiziertes Qualitätsmanagementsystem, das den Anforderungen der ISO 9001:2008 für die Herstellung von Geräten und biologischem Verbrauchsmaterial für Genvariation, Mutationsnachweis und anderen einzigartigen Biomarkertests genügt (Zertifikat-Nr. FM 538914).

www.transgenomic.com



TRANSGENOMIC®
the power of discovery

Marken und Copyright

Dieses Produkt wird unter exklusiver Lizenz für US-Patente 6,391,557; 5,869,245 hergestellt. Weitere Patente sind angemeldet. Die Verwendung der SURVEYOR Nuclease erfordert eine Lizenz von Transgenomic. Akademische, Non-profit- und For-profit-Organisationen besitzen mit Kauf dieses Produkts eingeschränkte Rechte, die SURVEYOR Nuclease zu Forschungszwecken zu nutzen. Wiederverkauf oder andere Verwendungszwecke sind streng verboten. Bitte wenden Sie sich für weitere Informationen an Transgenomic.

DNA-Polymerase: Die Verwendung dieses Produkts ist durch eines oder mehrere der folgenden US-Patente sowie zugehörige Patentansprüche außerhalb der USA geschützt: 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 sowie Ansprüche außerhalb der USA entsprechend der US-Patent-Nr. 4,889,818. Der Erwerb dieses Produkts beinhaltet eine eingeschränkte, nicht übertragbare zivilrechtliche Immunität unter den voranstehenden Patentansprüchen für den Gebrauch nur der Produktmenge, die der Käufer für seine interne Forschung benötigt. Es wird damit kein Recht unter einem anderen Patentanspruch (wie die patentierten 5'-Nuclease-Verfahrensansprüche unter US-Patent-Nummern 5,210,015 und 5,487,972), kein Recht zur Durchführung einer patentierten Methode sowie kein Recht zur Durchführung jedweder kommerzieller Dienstleistungen, insbesondere die Übermittlung von Ergebnisse der Tätigkeiten von Erwerbern gegen ein Honorar oder andere wirtschaftliche Gegenwerte, weder ausdrücklich noch implizit bzw. durch Rechtsverwirkung abgetreten. Dieses Produkt ist nur für Forschungszwecke zu verwenden. Diagnostische Verwendung unter Roche-Patenten benötigen eine gesonderte Lizenz der Firma Roche. Weitere Informationen zum Erwerb von Lizenzen über den Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

"TRANSGENOMIC", "the power of discovery", "WAVE", "SURVEYOR", "WAVE Optimized", "DNASep" und das Globe-Logo sind eingetragene Marken und "Navigator" ist eine Marke der Transgenomic, Inc. Alle anderen Marken sind Eigentum der entsprechenden Inhaber.

© 2010 Transgenomic, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Gedruckt in den USA.

Dokumenten-Nr. 482276-GE-04