

KRAS/NRAS CRC NGS IVD Panel

Navrženo pro
PGM-ION TORRENT a 454GS Junior

KÓD PRODUKTU: 1-1000-1-16

Balení: 16 reakcí

Uživatelská příručka

Rev02.2015



Obsah

1. POUŽITÍ VÝROBKU	3
2. OBSAH BALENÍ	4
3. SKLADOVÁNÍ	4
4. STABILITA PRODUKTU	4
5. PRINCIP TESTU	5
6. NEZBYTNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ	5
7. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE	6
8. PROTOKOL	6
<i>Izolace DNA z FFPE (tkání fixovaných formalínem a zalitých parafínem)</i>	6
<i>Kvantifikace DNA</i>	7
<i>NABOHACENÍ : Příprava cílově specifického master mixu PCR</i>	7
<i>Kvalitativní vyhodnocení PCR produktů</i>	8
<i>Kvantifikace PCR produktu</i>	9
9. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	12

1. POUŽITÍ VÝROBKU

KRAS/NRAS NGS IVD KIT je diagnostická sada pro analýzu pomocí sekvenace nové generace (NGS). Je založena na Dual Step Targeting PCR (DST), což je technologie vyvinutá společností HuGene, která umožňuje generování specifické knihovny pro analýzu genů uvedených v tabulce 1 za použití technologie NGS:

GEN	EXONY
KRAS	2, 3, 4
NRAS	2, 3, 4

Tabulka 1: Detail genů a exonů, na něž je zaměřen KRAS/NRAS CRC IVD PANEL

Operační protokol NGS analýzy technologií DST zahrnuje dvě po sobě jdoucí PCR reakce, které mají být provedeny pomocí dvou odlišných sad.

FÁZE 1: CÍLENÉ OBOHACENÍ MULTIPLEX PCR

Každý vzorek je amplifikován pomocí směsi primerů KRAS/NRAS pro multiplex amplifikaci šesti exonů. Produkty amplifikace budou nést specifické konce, které jsou nezbytné pro následující fázi barcodingu.

FÁZE 2: 2° PCR PRO ADAPTÉRY A VLOŽENÍ BARKÓDU

Adaptéry a sekvence barkódů jsou vloženy ve druhé PCR. Přímé i reverzní vlákna DNA jsou amplifikována pro každý ze vzorků, čímž je umožněna obousměrná analýza vytvořených DNA fragmentů.

Pro Ion Torrent

PGM BARCODE SET 1-8 (kód 2001)

PGM BARCODE SET 9-16 (kód 2001)

PGM BARCODE SET 17-24 (kód 2001)

PGM BARCODE SET 25-32 (kód 2001)

Pro 454GS Junior:

454 MID SET A (3x3) (kód 1001)

454 MID SET B (3x3) (kód 1002)

2. OBSAH KITU

KRAS/NRAS obsahuje všechna činidla potřebná pro cílené obohacení a vytvoření specifické obousměrné knihovny ampliconů určených pro analýzu sekvenace nové generace genů uvedených v tabulce 2.

Zkumavka	Popis	Objem	Cílové exony
KRAS/NRAS	OligoMix pro KRAS/NRAS	40 µl	2, 3, 4
Taq	Taq polymeráza vysoké kvality	11 µl	-
A	Reakční pufr A	224 µl	-
B	Reakční pufr B	224 µl	-
NTP	Směs dNTP	22,4 µl	-

Tabulka 2: obsah KRAS/NRAS NGS IVD KIT

NB: High-Fidelity Taq polymeráza, reakční pufr A, reakční pufr B a dNTP jsou dodávány ve větším množství, aby byl umožněn následující amplifikační postup nutný pro barcoding reakci za použití sad PGM BARCODE SET 1-8 (kód 2001), PGM BARCODE SET 9-16 (kód 2002), PGM BARCODE SET 16-24 (kód 2003), PGM BARCODE SET 25-32 (kód 2004), 454 MID SET A kit (3x3) (kód 1001), 454 MID SET B kit (3x3) (kód 1002).

3. SKLADOVÁNÍ

Všechna činidla dodávaná s našimi sadami jsou připravena k použití a měla by být skladována při -20 °C.

4. STABILITA PRODUKTU

Všechna činidla dodávaná se sadou si budou udržovat vysokou kvalitu až do vypršení data použitelnosti, které je označené na každé lahvičce činidla a na vnější nádobě/obalu.

5. PRINCIP TESTU

Tento test je založen na PCR reakci (polymerázová řetězová reakce). Reakční činidla, která jsou součástí sady, umožňují pomocí PCR reakcí amplifikaci specifických DNA sekvencí genů uvedených v tabulce 1. Specifické mutace těchto genů jsou klíčové a určují reakci pacientů na biologické léky. DNA může být izolována z rakovinných tkání zalitých parafínem (FFPE), vzorků z aspirace tenkou jehlou (FNA), nebo čerstvé zmrazené tkáně.

6. NEZBYTNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

EXTRAKCE DNA: pro extrakci DNA ze vzorků FFPE jsou doporučeny SIMPLEPREP FFPE (kat. č. SP-001-48) nebo SIMPLEPREP TOTAL RECOVERY (SP-002-48).

- Mikropipety 20-200 µl nebo 100-1000 µl a špičky
- Zkumavky 1,5 ml
- Termoblok pro 1,5ml zkumavky
- Mikroodstředivka
- Vortex
- Jednorázové rukavice

KVANTIFIKACE DNA:

- Mikropipety 2-20 µl, 20-200 µl nebo 100-1000 µl a špičky
- Fluorimetr Qubit® 2.0 (Invitrogen kód Q32866), nebo fluorimetr Qubit® 3.0 (Invitrogen kód Q33216)
- Testovací zkumavky Qubit (kat. č. Q32856)
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, kód Q32851)
- Vortex
- Jednorázové rukavice

1° PCR (CÍLENÉ OBOHACENÍ)

- Sada mikropipet pro PCR se špičkami
- Termocykler ABI9700 nebo Veriti nebo Proflex (Applied Biosystems)
- Zkumavka a víčka nebo 96-jamková destičku, dle potřeby, bez DNázy a RNázy
- Voda bez nukleázy
- Jednorázové rukavice

KVALIFIKACE DNA:

- Elektroforézní systém nebo
- Systém Agilent 2100 Bioanalyzer (důrazně doporučeno) se sadou činidel DNA 1000 (kat. č. 5067-1504)

7. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE

- Biologické vzorky a všechna činidla kitu KRAS/NRAS by měly být používány v místnostech řádně vybavených, čistých a ve kterých se nenacházejí potenciální kontaminanty. Doporučujeme pracovní plochy často čistit roztokem obsahujícím chlornan sodný 5 %.
- Vždy používejte ochranné pomůcky, jako je laboratorní plášť, rukavice a ochranné brýle, během všech fází popsaných v protokolu.
- Aby se zabránilo kontaminaci činidel, doporučujeme používat zkumavky a špičky bez DNáz/RNáz, věnujte zvláště pozornost tomu, aby všechny nástroje byly čisté a bez kontaminantů.
- Doporučujeme dodržovat jednosměrný pracovní postup od počáteční fáze izolace DNA v návaznosti na přípravné fáze PCR, fáze amplifikace a post-amplifikace, aby byly pracovní prostory pro různé fáze oddělené, a používat pro každou fázi postupu specializované laboratorní pláště, mikropipety, zkumavky a víčka.
- Použitá činidla a biologické vzorky musí být zlikvidovány v souladu s právními postupy.

8. PROTOKOL

Izolace DNA ze vzorků FFPE (vzorků tkání fixovaných formalínem a zalitých parafínem)

Pro izolaci DNA ze vzorků tkání fixovaných formalínem a zalitých parafínem doporučujeme použít HuGene SimplePrep FFPE Kit (SP-001-48).

Pro izolaci DNA z malého množství vzorků (tj. biopsií, mikrodisekcí nebo cytologických vzorků) doporučujeme používat HuGene SimplePrep Total Recovery Kit (SP-002-48).

Operativní protokol SimplePrep FFPE (není součástí balení, kód SP-001-48):

- a) Odeberte sterilním nástrojem přibližně 0,5 cm² řezu z FFPE bločku (nepoužívejte více než 0,5 cm² vzorku, protože by finální výsledek mohl být horší).
- b) Vložte vzorek do 1,5ml zkumavky a nalijte k němu 150 µl roztoku SimplePrep. Vzorek musí být roztokem SimplePrep kompletně pokrytý. Zkumavky krátce odstředíte, aby byl vzorek tkáně zcela ponořen.
- c) Inkubujte vzorek 60 minut při teplotě 56 °C.
- d) Vzorek rychle promíchejte a odstředíte.
- e) Pro denaturaci inkubujte vzorek 5 minut při teplotě 95 °C.
- f) Odstředíte vzorek při 14 000 otáčkách za minutu a 15 °C po dobu 5 minut. Parafín agreguje v horní části zkumavky na povrchu kapaliny, zatímco neštěpená tkáň se usadí na dně zkumavky. DNA se rozptýlí uprostřed roztoku mezi vrstvou parafínu (v horní části zkumavky) a neštěpené tkáně (ve spodní části zkumavky). Pokud nemáte k dispozici chlazené centrifugy, pracujte v klimatizované místnosti. Teplota nad 24 °C může bránit

tuhnutí parafínu, čímž nedochází k agregaci parafínu v horní části zkumavky. V případě neúplné parafínové agregace buďte velmi opatrní při nabírání středu roztoku s DNA a v další fázi snižte množství odebíraného vzorku.

- g) Naberte 100 µl ze střední části roztoku ve zkumavce s DNA a přelijte jej do jiné zkumavky.
- h) Vzorky DNA skladujte při teplotě 4 °C. Za těchto podmínek může být DNA skladována až jeden měsíc. Pro dlouhodobé uchování DNA skladujte při teplotě -20 °C.

Operativní protokol SimplePrep Total Recovery (není součástí, obj. kód SP-002-48)

- a) Přelijte 30 µl SimplePrep do zkumavky se vzorkem. Vzorek musí být roztokem SimplePrep kompletně pokrytý. Krátce vzorky odstředíte, aby se vzorek a roztok odstředil do spodní části zkumavek.
- b) Inkubujte vzorek 60 minut při teplotě 56 °C.
- c) Vzorek rychle promíchejte a odstředíte.
- d) Pro denuraci inkubujte vzorek 5 minut při teplotě 95 °C.
- e) Odstředíte vzorek při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut.
- f) Vzorky DNA skladujte při teplotě 4 °C. Za těchto podmínek může být DNA skladována až jeden měsíc. Pro delší dobu DNA skladujte při teplotě -20 °C

Kvantifikace DNA

8.2.1 Stanovte počáteční koncentraci DNA pomocí Qubit dsDNA HS Assay.

CÍLENÉ OBOHACENÍ: Příprava PCR reakce

Rozmrazte, krátce zvortexujte a odstředíte pufrů a dNTP. Udržujte Taq polymerázy při teplotě 4 °C.

Připravte reakční směs pro vzorky dle následující tabulky.

Směs pro 1 reakci	
Směs Primer Oligo	2 µl
Pufr A	4 µl
Pufr B	4 µl
dNTP	0.4 µl
Taq polymeráza	0.2 µl
DNA*	(10-100 ng)*
H ₂ O	až 20 µl
CELKEM	20 µl

Tabulka 3: Příprava PCR reakce

***Účinnost amplifikačního procesu je silně podmíněna kvalitou vzorku DNA. U nefragmentované DNA (tj. čerstvé tkáně, cytologických vzorků, ...) pro dobrý proces amplifikace obecně postačuje 10 ng. U fragmentované DNA (tj. FFPE vzorků) použijte 25-50 ng DNA pro každou PCR reakci. U vysoce fragmentované DNA je pro reakci možné zvýšit množství použité DNA až na 100-150 ng. Upozorňujeme, že získané hodnoty mohou být ovlivněny nadměrnou fixací formalínem, a tudíž může být výsledek nepřesný, obvykle nadhodnocením množství DNA.**

9.3.3 Umístěte reakční zkumavky do termocykleru a spusťte PCR s následujícím termálním profilem:

teplota	vteřiny	cykly
98 °C	60	1
98 °C	10	35
64 °C	20	
72 °C	20	
72 °C	120	1
4 °C	HOLD	

Tabulka 4: Teplotní profil PCR

Moment zastavení: Pokračujte následujícím krokem, nebo uložte amplifikované vzorky při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin, nebo při -20 °C po delší dobu.

Kvalitativní vyhodnocení PCR produktů (volitelné)

Ověřte kvalitu a kvantitu PCR produktů před započítáním barcodingu.

Analyzujte 4 µl každého produktu PCR v 2,5% agarózovém gelu na 60/90 minut při 90 voltech.
Ověřte délky fragmentů DNA dle následující tabulky:

SMĚS	GEN/EXON	bp
KRAS	KRAS Ex2	206
	KRAS Ex3	190
	KRAS Ex4	202
NRAS	NRAS Ex2	216
	NRAS Ex3	160
	NRAS Ex4	232

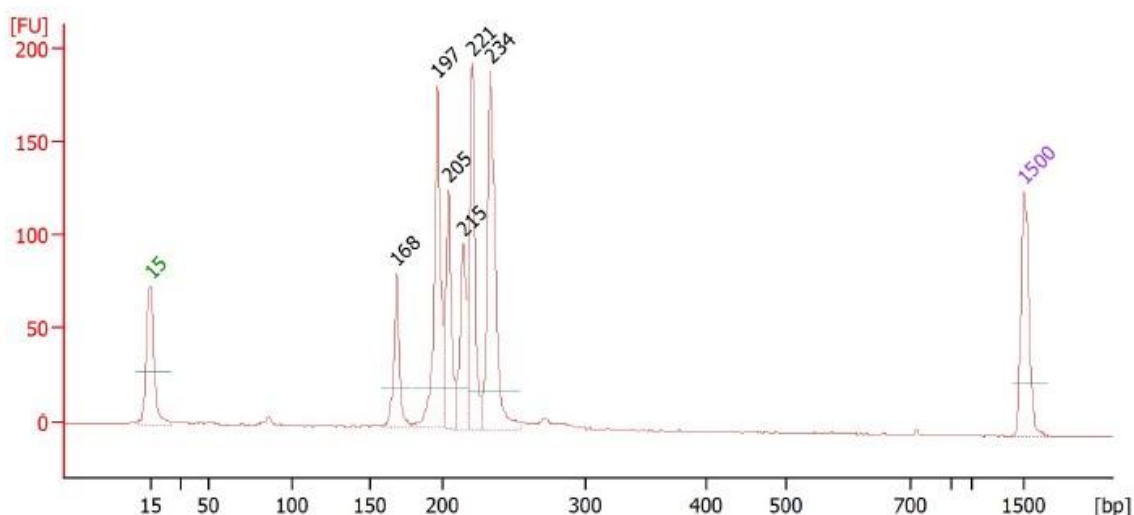
Tabulka 5: Délky DNA fragmentů

Kvantifikace PCR produktů

Produkty PCR kvantifikujte pomocí Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, kód Q32851).

Kvalitativní analýzu PCR produktů provádějte pomocí Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc)

Rychlý odhad velikosti DNA produktů lze získat analýzou vzorků na agarózovém gelu. Důrazně však k analýze s vysokým rozlišením PCR produktů doporučujeme použít Bioanalyzer 2100 se sadou DNA 1000.



Overall Results for sample 11 : KRAS/NRAS

Number of peaks found: 6

Peak table for sample 11 : KRAS/NRAS

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4,20	424,2	Lower Marker
2	NRASex3 168	2,03	18,3	
3	KRASex3 197	4,64	35,7	
4	KRASex4 205	2,92	21,6	
5	KRASex2 215	2,31	16,3	
6	NRASex2 221	4,09	28,1	
7	NRASex4 234	5,33	34,5	
8	1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Upozorňujeme, že pokud se ve vzorku nacházejí dimery oligonukleotidů, Bioanalyzer je identifikuje jako body s nízkou molekulovou hmotností. Vysoká koncentrace neočekávaných DNA fragmentů může svědčit o nízké účinnosti amplifikace během PCR reakce a může značit kontaminaci kvality vzorku. Pokud je koncentrace oligonukleotidových dimerů podstatně nižší než koncentrace očekávaných amplikonů (obr. 6), je možné přistoupit k další fázi barcodingu, aniž by byla ovlivněna následující fáze. Ředění požadovaného vzorku před následující fází barcodingu často dostačuje k tomu, aby se zabránilo další amplifikaci neočekávaných fragmentů DNA. Nicméně doporučujeme provést vyčištění všech vzorků, které obsahují oligonukleotidové dimery, pomocí Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc) nebo Diffinity Rapid Tips (Sigma-Aldrich).

Pokračuje následující fází barcodingu s jednou nebo více následujícími sadami:

:

- PGM BARCODE SET 1-8 (kód 2001)
- PGM BARCODE SET 9-16 (kód 2001)
- PGM BARCODE SET 17-24 (kód 2001)
- PGM BARCODE SET 25-32 (kód 2001)
- 454 MID SET A (3x3) (kód 1001)
- 454 MID SET B (3x3) (kód 1002)

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

PROBLÉM	MOŽNÁ PŘÍČINA	Doporučení
Absence očekávaných fragmentů na agarózovém gelu	Chybně naprogramovaný termocykler	Zkontrolujte teplotní profil a kalibraci a reakci opakujte
	Chyba při přípravě Master Mixu	Zkontrolujte složky PCR směsi a reakci opakujte
	Degradace reagensů	Zkontrolujte datum expirace a podmínky uskladnění sady
	Přítomnost inhibitorů	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu extrahované DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci.
	Nedostatečná kvantita DNA	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci
Přítomnost smíru na agarósovém gelu	Degradace templátové DNA	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci DNA
Přítomnost fragmentů s nízkou molekulovou hmotností	Zbytky primerů a/nebo zhoršení kvality adaptérů, výskyt dimerů oligonukleotidů, atd.	Eliminujte fragmenty s nízkou molekulovou hmotností za použití kalibračních postupů pomocí AMPure XP Beads nebo Diffinity Rapid Tips