



EliGene[®] Colorectum NGS

REF 90066-NGS (24 reakcí)

Složení soupravy:

2 x 240 µl **COLORECTUM NGS Mix**
1 x 20 µl **PC COLORECTUM NGS**
Návod k použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

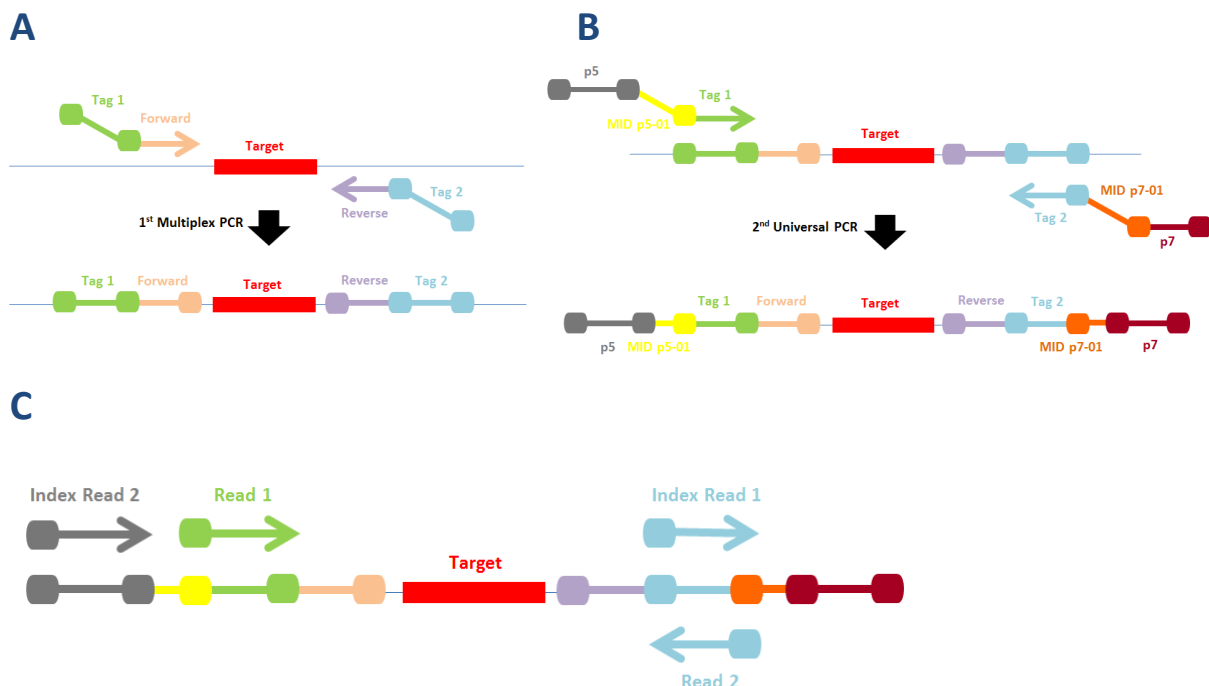
EliGene[®] Colorectum NGS souprava je určena pro multiplexovou PCR cílových sekvencí v rámci genů KRAS (Exony 2, 3 a 4), NRAS (Exony 2, 3 a 4) a BRAF (Exon 15) umožňujících detekci polymorfismů v rámci amplifikovaných cílových oblastí.

Princip metody

EliGene[®] NGS kity umožňují multiplexovou PCR požadovaných cílových oblastí v rámci analyzovaných genů. Doporučené množství vstupní DNA do této multiplexové reakce je mezi 20-100 ng DNA získané izolací z formalinem fixovaných parafinových bločků (FFPE) nebo krve. Následně jsou takto získané amplikony z jednotlivých vzorků označeny MID sekvencemi a smíchány dohromady. Takto připravený vzorek je následně kvantifikován a sekvenován pomocí NGS přístroje Illumina umožňující multi-paralelní sekvenaci (MPS) dle návodu výrobce. Výsledné sekvence jsou následně srovnány s referenčními sekvencemi jednotlivých analyzovaných genů pro identifikaci polymorfismů.

Obecný úvod

Pomocí EliGene[®] NGS kitů dochází v jedné nebo více multiplexových PCR k amplifikaci cílových oblastí z jednoho vzorku (Obrázek 1A). K amplifikaci je využit ready-to-use mastermix obsahující hot-start DNA polymerázu. Výsledné amplikony jsou následně 100x zředěny. V následné PCR reakci za použití EliGene[®] Adaptor-IL NGS soupravy jsou ke všem amplikonům z první PCR přidány MID sekvence společně s p7 a p5 adaptory nutnými pro sekvenaci na sekvenátoru MiSeq (Illumina) (Obrázek 1B). Výsledné amplikony z jednoho vzorku jsou následně smíchány dohromady dle daného postupu, přečištěny od sekvencí kratších 150 bp a kvantifikovány pomocí Real-Time PCR za využití standardů. Takto přečištěné a označené amplikony jednotlivých vzorků jsou následně ve stejném poměru smíchány dohromady za vzniku výsledné směsi amplikonů pro sekvenční reakci. Sekvenační reakce je poté provedena na přístroji MiSeq (Illumina) dle návodu výrobce za použití specifických sekvenačních primerů z EliGene[®] Adaptor-IL NGS soupravy. V rámci sekvenčního běhu je provedena můstková PCR pro vytvoření jednotlivých klastrů, na kterých jsou prováděna jednotlivá sekvenační čtení. Poloha jednotlivých sekvenačních primerů dodávaných v rámci EliGene[®] NGS souprav a sekvenční chemie firmy Illumina, jsou uvedeny na obrázku 1C).



Obrázek 1. Schéma procesu vedoucí k multiplexové amplifikaci cílových sekvencí (A), přidání adaptorů p7 a p5 obsahující MID sekvence (B) a struktura výsledného produktu pro sekvenaci na přístroji MiSeq (Illumina) (C)

Odběr vzorku, zpracování a uchovávání

Klinický materiál:	Doporučená izolace DNA:
Krev	Manuální: EliGene® Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) Automatická: Zephyrus Magneto (ELISABETH PHARMACON)
FFPE bločky	Manuální: EliGene® FFPE Tissue DNA Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON)

Krev:

Manuální izolace:

Ke vzorku přidejte 10 µl Proteinázy K a poté pokračujte dle standardního izolačního protokolu kitu EliGene® Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) pro izolaci DNA z krve. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

Automatická izolace:

Izolujte DNA ze vzorku pomocí **MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu** dle protokolu pro vzorky krve s elucí do 50 µl elučního pufru.

FFPE bločky:

Tyto vzorky izolujte dle standardního protokolu uvedeného u kitu EliGene® FFPE Tissue DNA Isolation Kit.



Nezbytné vybavení pro laboratoř

Materiál	Požadavky
Sekvenační přístroj a příslušná sekvenční chemie	Illumina MiSeq
Software pro zpracování a analýzu dat generovaných sekvenátorem	BaseSpace, MiSeq Reporter, Variant Caller Studio (Illumina)
Sekvenační chemie Illumina	MiSeq Reagent Nano Kit, v2 (500 cycles), MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle)
TE pufr	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH=8.0
PCR cyklér	S možností nastavení teplotní rampy 1°C/s, přesností teploty +/- 0.3°C (50-95°C) a uniformitou bloku <0.5°C.
Real-time PCR cyklér	S možností detekce SYBR Green barvy
Kvantifikační kit na knihovnu Illumina	Elisabeth Pharmacon, EliZyme™ Library Quantification Kit
Agarózový gel nebo jiný separační systém	2% agarózový gel, 1 x TBE pufr, DNA barvivo, elektroforetická vana nebo Agilent 2100 Bioanalyzer s Agilent High Sensitivity DNA Kitem
Hi-Di Formamid	Life Technologies cat. no. 4311320
GS600 size standard	Life Technologies (e.g. GS600 LIZ®, kat.č. 4408399)
Analyzátor DNA fragmentů	Capillary Genetic analyzer with GeneMapper software (Life Technologies)
GeneRead Size Selection Kit (50)	Qiagen, kat.č. 180514
Vortex	
Centrifuga	1.5 ml zkumavky, 12 000 x g
Sterilní automatická pipeta 5–20 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz	
Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz	
Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.	
Laboratorní ochranné rukavice	

Příprava reagensí

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.



Příprava reakčního mixu

Upozornění: Následující postup musí být prováděn kvalifikovanou osobou a jakékoli odchylky od tohoto postupu mohou vést k chybným výsledkům.

Reagencie v tomto kitu jsou určeny k multiplexové PCR požadovaných cílových oblastí v rámci analyzovaných genů. Doporučené množství vstupní DNA do této multiplexové reakce je mezi 20-100 ng DNA získané izolací z formalinem fixovaných parafinových bločků (FFPE) nebo krve.

1. Nechte rozmrznout zkumavku obsahující COLORECTUM NGS Mix.
2. Po rozmrazení obsah zkumavky krátce zvortexujte a stočte.
3. Dle tabulky uvedené níže připravte PCR směsi pro požadovaný počet vzorků.

COLORECTUM NGS Mix	Vzorek DNA (20-100 ng)	PCR voda
20 µl	1-5 µl	Do objemu 25 µl

4. Výslednou PCR reakční směs promíchejte, stočte a vložte do PCR cycleru a spusťte následující teplotní profil

Teplotní profil:

95°C	15 min	
94°C	30 s	
60°C	90 s	35x
72°C	90 s	
72°C	5 min	

Nastavte teplotní rampu mezi 1-2°C/s

Neskladujte PCR produkty v lednici, pokud je nebudete ihned zpracovávat, uchovávejte je při -20°C.

Odečet výsledků

Úspěšný průběh multiplexové PCR může být ověřen pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu za použití TBE separačního pufru. Úspěšná amplifikace všech cílových oblastí je pozorována jako 7 proužků o velikostech: KRAS (Ex2) 194bp, KRAS (Ex3) 321 bp, KRAS (Ex4) 334 bp, NRAS (Ex2) 228 bp, NRAS (Ex3) 300 bp, KRAS (Ex4) 258 bp, BRAF (Ex15) 279 bp.

Kontrolní postup

Použití kontrol

Souprava EliGene® Colorectum NGS využívá jako pozitivní kontrolu uměle vytvořenou část lidské DNA. Tato pozitivní kontrola slouží k ověření funkčnosti amplifikačního mixu a PCR cycleru. Velmi se doporučuje pro každou sadu vzorků použít negativní kontrolu (PCR vodu), pro detekci případné kontaminace pracovního prostoru, která může vést ke zkresleným výsledkům analýzy.



Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci a multiplexoru PCR můžete použít referenční materiál pozitivní na variace ve sledovaných oblastech. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

Řešení problémů

V případě, že nedojde ke správné amplifikaci, může jít o chybu v reakční směsi, o chybu PCR cycleru nebo o použití kitu po době expirace.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

EliGene® Colorectum NGS souprava je určena pro multiplexovou PCR cílových sekvencí v rámci genů KRAS (Exony 2, 3 a 4), NRAS (Exony 2, 3 a 4) a BRAF (Exon 15) umožňujících detekci polymorfismů v rámci amplifikovaných cílových oblastí. Výchozím materiálem je DNA izolovaná z krve nebo FFPE bločků.

Analytická citlivost je 20 ng DNA v reakční směsi.

Analytická specifita metodiky je 100% a byla ověřena prohledáváním DNA databází.

Klinická specifita

Diagnostické funkční charakteristiky:

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci při koncentraci DNA ≥ 20 ng DNA v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality slouží vlastní amplifikace sledovaných oblastí.

Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace a amplifikace DNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

Upozornění

Nevyužitý obsah zkumavky s MasterMixem je stabilní po dobu 2 týdnů při -20 °C. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem více než 5-krát! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.



Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započetím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci kitu a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensy ze souprav jiných výrobců!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagensy musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.



Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Mikrozkušavka obsahující reakční mix (COLORECTUM NGS Mix) je určena pouze pro jedno použití a musí být použita pouze pro přípravu reakční směsi.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Literatura

De Leeneer K, De Schrijver J, Clement L, Baetens M, Lefever S, et al. (2011) Practical Tools to Implement Massive Parallel Pyrosequencing of PCR Products in Next Generation Molecular Diagnostics. PLoS ONE 6(9): e25531. doi:10.1371/journal.pone.0025531

Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98/79/EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz

