ELISABETH PHARMACON Ltd.
Namesti Svobody 18
602 00 Brno
Phone: +420 542 213 851
Fax: +420 542 213 827
E-mail: info@elisabeth.cz
Web: www.elisabeth.cz
VAT: CZ26258412

EliGene® Adaptor-IL NGS

REF **90069-NGS** (96 reakcí)

Složení soupravy:

3 x 700 µl **Adaptor-IL Mix**	1 x 40 µl **p501 MID Primer**
1 x 40 µl **p701 MID Primer**	1 x 40 µl **p502 MID Primer**
1 x 40 µl **p702 MID Primer**	1 x 40 µl **p503 MID Primer**
1 x 40 µl **p703 MID Primer**	1 x 40 µl **p504 MID Primer**
1 x 40 µl **p704 MID Primer**	1 x 40 µl **p505 MID Primer**
1 x 40 µl **p705 MID Primer**	1 x 40 µl **p506 MID Primer**
1 x 40 µl **p706 MID Primer**	1 x 30 µl **RP1 Primer**
1 x 40 µl **p707 MID Primer**	1 x 30 µl **RP2 Primer**
1 x 40 µl **p708 MID Primer**	1 x 30 µl **Index Primer**

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® Adaptor-IL NGS souprava je určena pro inkorporaci Molekulárních identifikátorů (MIDs) a specifických adaptorových sekvencí k PCR produktům amplifikovaným v multiplexové PCR cílových sekvencí v rámci EliGene® NGS kitů umožňujících detekci polymorfismů v rámci amplifikovaných cílových oblastí.

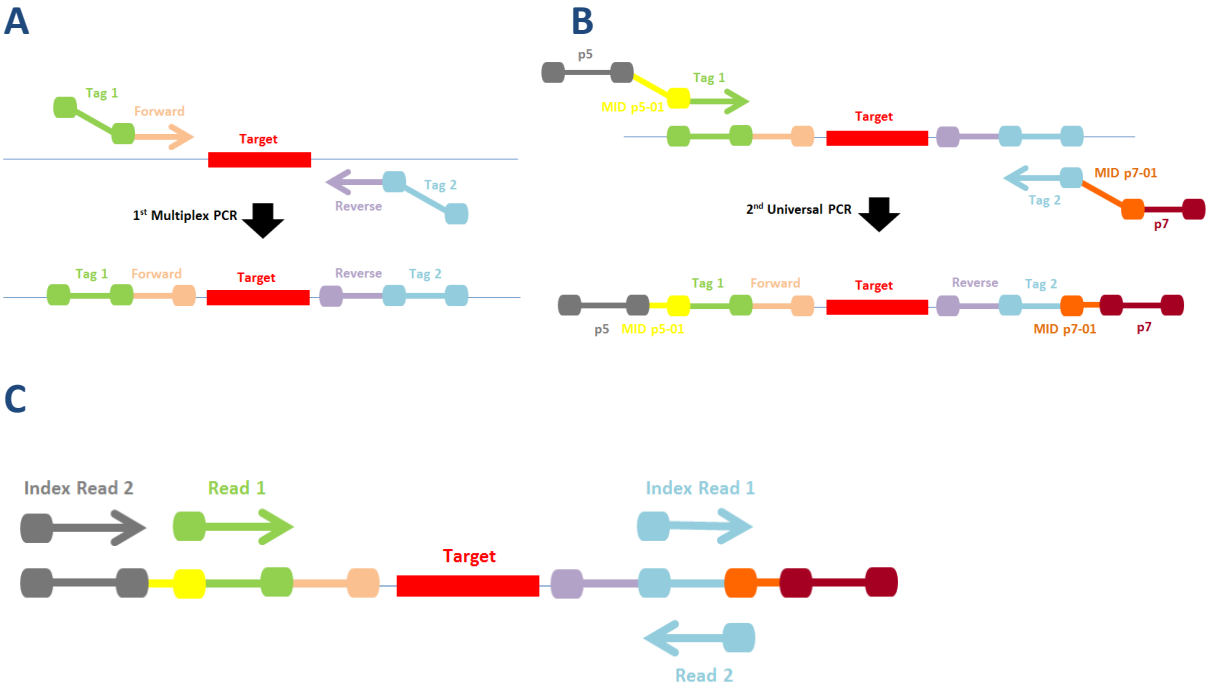
Princip metody

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). 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 (Obrázek 1c). V rámci sekvenčního běhu je provedena můstková PCR pro vytvoření jednotlivých klastrů, na kterých jsou prováděná jednotlivá sekvenační

čtení. Poloha jednotlivých sekvenčních 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 sekvenci (A), přidání adaptorů p7 a p5 obsahující MID sekvence (B) a struktura výsledného produktu pro sekvenci na přístroji MiSeq (Illumina) (C)

Vzorek

Amplikony vzniklé v rámci multiplexové PCR reakce dodávané v rámci kitů EliGene® Lung NGS, EliGene® Colorectum NGS a EliGene® GIST NGS.

Pro vlastní analýzu je nezbytné, aby byly amplikony vzniklé v rámci multiplexové PCR ihned zpracovány nebo uchovávány při -20°C. V žádném případě se nedoporučuje skladování vzniklých amplikonů při 4°C.

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), MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle)
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	KAPA Biosystems, KAPA 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 prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz	
Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz	
Sterilní stojánek prostý DNA/RNA a DNáz a RNáz.	
Laboratorní ochranné rukavice	

Příprava reagencií

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagencie zcela rozmražené, 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 inkorporaci specifických MID sekvencí a p5, p7 adaptorů nezbytných pro vlastní sekvenční běh na přístroji MiSeq. Pro každý vzorek (včetně negativní kontroly) určený pro sekvenční běh musí být použita jedinečná kombinace MID p7-p5 primerů. Pro předejití problémů vyplývajících z nízké nukleotidové diverzity v MID sekvencích na přístroji MiSeq použijte pomocnou šablonu pro návrh dostupnou v sekci NGS kity na stránkách www.elisabeth.cz nebo na CD přiloženém u kitu. Pokud budete sekvenovat vzorky s alelickou frekvencí nižší než 20%, velmi se doporučuje nepoužívat stejné kombinace MIDů ve dvou po sobě jdoucích bězích.

1. Nechte rozmrznout zkumavky obsahující příslušné MID p7 a p5 primery vybrané na základě kombinační šablony a zkumavku obsahující PCR Mix.
2. Po rozmrazení obsah všech zkumavek krátce zvortexujte a stočte.
3. Dle tabulky uvedené níže připravte PCR směsi pro každou kombinaci MID primerů.

PCR Mix	MID p7 Primer	MID p5 Primer
20.00 µl	2.0 µl	2.0 µl

4. Následně do amplifikační směsi přidejte 1 µl PCR produktu z předchozí Multiplex PCR naředěného v poměru 1:100 PCR vodou. Ředění se doporučuje provádět v objemu alespoň 200 µl (např. smícháním 2 µl PCR produktu se 198 µl PCR vody, zvortexováním a stočením).
5. Výslednou PCR reakční směs promíchejte, stočte a vložte do PCR cycleru a spusťte následující teplotní profil

Teplotní profil:

95°C	3 min	
95°C	15 s	
60°C	20 s	20x
72°C	60 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.

Přečištění knihovny

Každou amplikonovou knihovnu je nutné před dalším použitím přečistit od krátkých fragmentů pomocí GeneRead Size Selection Kitu (Qiagen).

1. Smíchejte 25 µl amplifikačního produktu se 100 µl SB1 pufru, promíchejte krátce na vertexu a stočte.
2. Přepipetujte směs do MinElute spin kolonky a centrifugujte 1 min při 12000 až 14000 x g.
3. Proteklý roztok vylijte a nepipetujte na kolonku 700 µl 80% etanolu a znovu centrifugujte 1 min při 12000 až 14000 x g.
4. Opakujte krok 3.
5. Odstraňte proteklý roztok a centrifugujte prázdnou MinElute spin kolonku 1 min při 12000 až 14000 x g.
6. Vložte MinElute spin kolonku do nové 1.5 ml zkumavky a přidejte 17 µl EB pufru na střed membrány a nechte kolonku stát 1 minutu na stole.

7. Následně centrifugujte kolonku 1 min při 12000 až 14000 x g. Eluovaná DNA je poté připravena k použití.

Stanovení koncentrace knihovny

1. Koncentraci knihovny stanovte pomocí qPCR za využití KAPA Library Quant Kitu (KAPA Biosystems), kdy postupujte dle přiloženého návodu pro kvantifikaci v reakčním objemu 10 µl, kdy kvantifikace vzorku a standardů se doporučuje provádět alespoň v duplikátu a průměrné délky amplikonů pro mixy ze souprav řady EliGene® NGS jsou pro COLORECTUM NGS Mix 410 bp, LUNG NGS Mix 390 bp, c-Kit NGS Mix 390 bp a pro PDGFR NGS Mix 380 bp.
2. Před vlastní kvantifikací se doporučuje provést ředění vzorků získaných po přečištění pomocí GeneRead Size Selection Kitu (Qiagen) 1:10000 a 1:50000. Ředění se doporučuje provádět ve dvou po sobě jdoucích krocích (např. smícháním 2 µl vzorku se 198 µl PCR vody, zvortexováním a stočením a opětovným smícháním 2 µl takto naředěného produktu se 198 µl PCR vody, zvortexováním a stočením).
3. Pro předejití problémů vyplývajících ze špatného výpočtu výsledné koncentrace vzorků použijte pomocnou šablonu pro Kvantifikaci knihovny dostupnou v sekci NGS kity na stránkách www.elisabeth.cz nebo na CD přiloženém u kitu.
4. Jednotlivé vzorky se stanovenou koncentrací nařeďte dle šablony pro kvantifikaci knihovny na 4 nM v 1 x TE , zvortexujte a krátce stočte.
5. Pokud možno ihned pokračujte v dalším postupu nebo vzorky zamrazte na -20°C.

Smíchání jednotlivých amplikonových knihoven

- Dbejte na to, abyste míchali pouze knihovny obsahující unikátní MID kombinaci.
- Velmi se doporučuje dosáhnout alespoň minimálního pokrytí 100x na jednotlivý vzorek. Nicméně vyšší pokrytí může být nezbytné pro případy variant s nízkou frekvencí.
- Pro výpočet počtu vzorků na jednotlivý sekvenční běh musíte započíst přidání PhiX kontroly v koncentraci 5% dle doporučení výrobce.
- V případě detekce somatických mutací je nezbytné vzít v potaz množství nádorové tkáně (TTC) v FFPE vzorku. Naředěná knihovna vzorku s nižším procentem TTC vyžaduje vyšší poměr ve finální směsi (např. knihovna ze vzorků obsahující 80% a 40% TTC vyžaduje přidání dvojnásobného množství vzorku s obsahem TTC 40% oproti vzorku s obsahem TTC 80%).
- Smíchejte jednotlivé knihovny dle schématu uvedeného v šabloně pro kvantifikaci knihovny dostupné v sekci NGS kity na stránkách www.elisabeth.cz nebo na CD přiloženém u kitu, krátce zvortexujte a stočte.
- Velmi se doporučuje provést ještě jednou kvantifikaci takto vzniklé knihovny pro ověření, zdali je koncentrace 4 nM.
- Ihned pokračujte v dalším postupu nebo směsnou knihovnu zamrazte na -20°C.

Můstková PCR a sekvenace

Před každou analýzou se velmi doporučuje provést maintenance proplach. Směs amplikonů může být následně zpracována jedním ze sekvenčních kitů firmy Illumina, které obsahují všechny nezbytné reagencie pro provedení sekvenace z připravené amplikonové knihovny na přístroji MiSeq dle níže uvedeného postupu.

- Zvolte si příslušný Illumina sekvenační kit: v2 (500 cyklů, 2x250 reads), kdy počet Read1 a Read2 cyklů nastavte na 201.

- Pro Custom sekvenační běh budete potřebovat vlastní sekvenační primery a index primer, které jsou dodávány jako součást tohoto kitu v 50 uM koncentracích. Tyto tři primery jsou nazvány:

  RP1 - Read1 Seq Primer

  Index - Index Seq Primer

  RP2 - Read2 Seq Primer

- Každý primer nařeďte na 0.5 µM koncentraci smícháním 6 µl 50 µM zásobního roztoku s 594 µl HT1 (Hybridizačního) pufru. Směs dobře promíchejte a stočte.
- 600 µl takto naředěných primerů napipetujte do sekvenční kazety do těchto pozic:

  Read1 seq Primer do pozice 18

  Index Seq Primer do pozice 19

  Read2 seq Primer do pozice 20
- Zkontrolujte, že na dně jamek kazety nejsou vzduchové bublinky anebo je odstraňte.
- Dle manuálu k přístroji MiSeq zdenaturujte a připravte knihovnu obsahující směs amplikonů. Pro MiSeq Reagent kity v2 doporučujeme začít s 4-6 pM ředěním. Toto množství však může být měněno pro dosažení optimální hustoty klastrů na vašem systému.
- Pro vytvoření výsledného vzorku přidejte dle manuálu k přístroji MiSeq PhiX kontrolu ve výsledné koncentraci 5% (kat.č. FC-110-3001, Illumina).
- Napipetujte 600 µl výsledného vzorku do pozice Load Samples.
- Pomocí Illumina Experiment Manager vytvořte SampleSheet dle následujících pokynů:

1) Zvolte přístroj “MiSeq“.
2) Vyberte kategorii “Targeted Resequencing”, následně vyberte “PCR Amplicon” a kliknete Next.
3) Vyplňte “PCR Amplicon Run“ nastavení s následnými parametry:

   Sample Prep Kit: vyberte “Nextera”

   o Index Reads: zvolte “2”

   o Read Type: vyberte “Paired End”

   o Cycles Read1: 201

   o Cycles Read2: 201

   o Nechejte zvolené “Use Adapter Trimming”
4) Změňte PCR Amplicon Workflow následovně: zvolte 3 “Custom Primers“ a klikněte Next.
5) Přidejte do SampleSheet vzorky, kdy správný Manifest soubor si stáhněte ze sekce NGS kity na stránkách www.elisabeth.cz nebo z CD u kitu.

- Dále postupujte dle kroků uvedených v MiSeq Control Software (MCS) rozhraní.

Odečet a Interpretace výsledků

Datový soubor

Přístroj MiSeq generuje pro každý klastr dvě čtení (Read1 a Read2), které poté definuje jako čtecí pár (read pair). Za pomocí dvou indexovaných čtení je poté automaticky provedena de-multiplexace dat pomocí programu MiSeq Reporter jejímž výsledkem jsou FASTQ soubory dle definice vzorků v tabulce “SampleSheet“. Tyto FASTQ soubory obsahují pouze data ze čtení, která prošly filtrem kvality.

ELISABETH PHARMACON Ltd.
Namesti Svobody 18
602 00 Brno
Phone: +420 542 213 851
Fax: +420 542 213 827
E-mail: info@elisabeth.cz
Web: www.elisabeth.cz
VAT: CZ26258412

Struktura sekvenačních čtení

Jednotlivá čtení mají následující strukturu: Čtení 1 (Read1) začíná oblastí obsahující PCR přímý primer a pokračuje amplifikovanou oblastí. V některých případech může tato sekvence pokračovat reverzní sekvencí zpětného primeru. Čtení 2 (Read2) má podobnou strukturu, kdy začíná oblastí obsahující PCR zpětný primer a pokračuje amplifikovanou oblastí. V některých případech může tato sekvence pokračovat reverzní sekvencí přímého primeru. V rámci správného vyhodnocení získaných dat je nezbytné vystřižení "Trimming"použitých PCR primerů

Srovnání dat k referenční sekvenci

Sekvenační čtení mohou být srovnána k cílové oblasti sekvence pro lidský genom. K usnadnění vyhodnocení specifických informací (např. pozic mutací) obsažených v rámci získaných dat mohou být použity různé programy, jako např. Variant Studio program firmy Illumina.

- Při analýze pomocí programu Illumina® VariantStudio™ ver. 2.2.2 nebo vyšší je doporučeno postupovat dle instrukcí výrobce.
- Prvně nainstalujte a spusťte program z Illumina® Base Space®. Zvolte si váš projekt a po spuštění programu vyberte ze seznamu soubor, který má být přidán. Pro import jednotlivých variant z vašeho VCF souboru zvolte možnost „All variants „.
- Referenční sekvence pro „Genes" KRAS, NRAS, BRAF, PDGFRAα, c-Kit a EGFR jsou zadány v sample sheet souboru dle tabulky 1 níže.

Tabulka 1. Referenční sekvence pro geny dle referenční sekvence hg19

Name	Chromosome	Amplicon Start	Amplicon End
NRAS_Ex2	chr1	115258600	115258827
NRAS_Ex3	chr1	115256394	115256693
NRAS_Ex4	chr1	115252139	115252396
KRAS_Ex2	chr12	25398151	25398344
KRAS_Ex3	chr12	25380077	25380397
KRAS_Ex4	chr12	25378457	25378790
BRAF_Ex15	chr7	140452987	140453265
PDGFRA_Ex8	chr4	55136751	55136967
PDGFRA_Ex10	chr4	55139665	55139930
PDGFRA_Ex12	chr4	55140985	55141199
PDGFRA_Ex14	chr4	55143970	55144249
PDGFRA_Ex18	chr4	55151973	55152205
CKIT_Ex9	chr4	55591944	55592236
CKIT_Ex11	chr4	55593514	55593750
CKIT_Ex13	chr4	55594120	55594371
CKIT_Ex14	chr4	55595417	55595724
CKIT_Ex15	chr4	55597418	55597689
CKIT_Ex16	chr4	55597939	55598192
CKIT_Ex17	chr4	55599207	55599372
EGFR_Ex18	chr7	55241580	55241823

EGFR_Ex19	chr7	55242332	55242535
EGFR_Ex20	chr7	55248879	55249188
EGFR_Ex21	chr7	55259388	55259645

- Klikněte na možnost “All Variants of Current Sample” v nabídce “Annotate” možnosti “Annotation and Classification”.
- V záložce „General“ (levý panel) zvolte všechny typy genotypů „Genotypes“, všechny varianty „Variant Type“ a všechny chromosomy „All Chromosomes” v záložce „Chromosomes“.
- V nabídce “Variant” nastavte u vzorků “Pass Filter”.
- Po provedení analýzy ověřte pokrytí u každé nalezené varianty, což odpovídá počtu čtení pro tuto jednotlivou variantu. Minimální hodnota pokrytí pro klinickou diagnostiku musí být ≥ 100 páru čtení. Pouze varianty s touto hodnotou mohou být vyhodnoceny, všech ostatní by měly být vyloučeny z důvodu nízkého pokrytí.

Kontrolní postup

Minimální pokrytí a alelická frekvence

Pro detekci somatických mutací je nezbytné, aby pokrytí (počet párovaných čtení) bylo minimálně 100 čtení/alelu. Doporučuje se, aby oblasti s nižším pokrytím nebyly brány v úvahu v rámci analýzy a byly vyřazeny s výsledného hodnocení. V případě alelické frekvence varianty (variant allele frequency) je poté minimální doporučená hodnota 25% při minimálním počtu 100 čtení/alelu.

Skóre kvality (Quality score)

Kvalita srovnání bazí v místě detekované varianty má velký vliv na spolehlivost odečtu. Tato kvalita je především dána pozicí varianty (kvalita čtení většinou vzrůstá během prvních 20 cyklů a poté zůstává konstantní až do posledních 20 cyklů, kde opět klesá) v rámci čtení a složením genomu v místě varianty (např. homopolymerní úseky mají negativní vliv na kvalitu). Pokud dochází při dvousměrné čtení k překryvu v rámci čtení, oblast překryvu mívá vždy vyšší hodnotu Q-Score ve srovnání s krajními oblastmi čtenými pouze jednou. Obzvláště nutné je dávat speciální pozor v oblastech, kde se vyskytují homopolymerní oblasti v délce 10 bp a více.

Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci, přípravu knihovny a sekvenaci můžete použít referenční materiál pozitivní na variace ve sledovaných oblastech. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

Řešení problémů

1. V případě, že nedojde ke správné sekvenaci amplikonů, může jít o chybu v přípravě knihovny, v kvantifikaci knihovny nebo v přípravě sekvenačního běhu.
2. Pokud dojde k ověření správnosti přípravy knihovny, může jít rovněž o chybu v sekvenční chemii nebo o použití kitu po době exspirace nebo o závadu na přístroji MiSeq pro sekvenaci.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Kit EliGene® Adaptor-IL NGS je určen pro začlenění adaptorových sekvencí nutných pro provedení sekvenace na přístroji MiSeq. Výchozím materiálem jsou amplifikáty vzniklé v rámci multiplexové PCR v rámci kitů EliGene NGS.

Analytická citlivost je 0,1 ng DNA v reakční směsi.

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

Měřící interval

Souprava umožňuje detekci ≥ 0,1 ng DNA molekul 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 reagenciemi a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagenciemi. 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 reagenciemi.
- Likvidujte zbylé reagencie 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 exspirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagencie poskytované v rámci kitu a reagencie doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagencie z různých šarží!
- Nepoužívejte reagencie 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 reagenciemi 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

- Mikrozkumavky obsahující mixy (Adaptor-IL Mix) jsou určeny pouze pro jedno použití a musejí být použity 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

REF — Katalogové číslo

Horní teplotní hranice

LOT — Číslo šarže

Spotřebujte do (poslední den v měsíci).

IVD — Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*

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

Σ — Obsah dostatečný pro "N" testů

Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.

Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Náměstí Svobody 18, 602 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, Fax: +420 542 213 827
E-mail: info@elisabeth.cz