



# Istruzioni d'uso di CRC *RAScan*<sup>™</sup> Combination Kit

Un kit SURVEYOR<sup>®</sup> Scan *KRAS* e *NRAS*  
Exons 2, 3 & 4 CE IVD

con sistemi DHPLC



**Leggere attentamente il manuale prima di utilizzare il prodotto.**

**Conservare il manuale a titolo di riferimento per il futuro.**





**Questa pagina è stata lasciata intenzionalmente vuota**

# Indice

<b>1 Produttore</b> .....	<b>3</b>
<b>2 CRC RAScan™ Combination Kit</b> .....	<b>3</b>
2.1 Uso previsto .....	3
2.2 Indicazioni per l'uso.....	3
<b>3 Principi del dosaggio di rilevamento della mutazione di CRC RAScan KRAS and NRAS</b> .....	<b>4</b>
3.1 KRAS e NRAS .....	4
3.2 Analisi di campioni paziente con i kit SURVEYOR Scan.....	4
3.3 SURVEYOR Nuclease.....	5
<b>4 Tracciabilità dei controlli del kit</b> .....	<b>6</b>
<b>5 Componenti</b> .....	<b>7</b>
5.1 Scatola SURVEYOR Scan KRAS Kit Exons 2, 3 & 4 (REF 710107).....	7
5.2 Scatola SURVEYOR Scan NRAS Kit Exons 2, 3 & 4 (REF 710400) .....	8
5.3 Numero di Campioni Analizzabili con un Kit .....	8
5.4 Sequenziamento del DNA.....	9
<b>6 Apparecchiature e reagenti aggiuntivi richiesti</b> .....	<b>9</b>
<b>7 Preparazione del reagente</b> .....	<b>9</b>
<b>8 Conservazione e Durata</b> .....	<b>10</b>
<b>9 Avvertenze e precauzioni</b> .....	<b>10</b>
<b>10 Raccolta, manipolazione e conservazione del campione</b> .....	<b>10</b>
<b>11 Procedura di dosaggio</b> .....	<b>11</b>
11 Rilevamento di una Mutazione Somatica con i Kit SURVEYOR Scan – Considerazioni Generali .....	11
<b>12 Istruzioni dettagliate</b> .....	<b>12</b>
12.1 Configurazione/calibrazione <b>INIZIALE</b> di DHPLC .....	12
12.2 Considerazioni prima dell'Analisi del Campione KRAS e NRAS .....	12
12.3 Considerazioni sul template .....	12
12.4 Considerazioni sul flusso di lavoro.....	12
12.5 Protocollo di amplificazione .....	15
12.6 Programma del termociclatore per il protocollo di amplificazione .....	18
12.7 Controllo qualità di prodotti PCR.....	18
12.8 Digestione di SURVEYOR Nuclease .....	19
<b>13 Procedure di controllo</b> .....	<b>20</b>
13.1 Controllo della qualità di CRC RAScan Combination Kit .....	20
13.2 Uso di DNA plasmidici di controllo.....	20
<b>14 Interpretazione dei risultati</b> .....	<b>21</b>
14.1 Analisi di KRAS e NRAS Exons 2, 3 e 4 utilizzando SURVEYOR Nuclease .....	21
14.2 Revisione dei dati dei risultati SURVEYOR Scan .....	22
14.3 Esempi dei risultati .....	23
<b>15 Caratteristiche prestazionali</b> .....	<b>30</b>
15.1 Livello di rilevamento delle mutazioni mediante i kit SURVEYOR Scan .....	30
15.2 Conferma Mediante Sequenziamento.....	30
15.3 Limitazioni della procedura di dosaggio.....	31
<b>Appendice A</b> .....	<b>32</b>
A.1 Piano di layout della piastra per kit SURVEYOR Scan.....	32
A.2 Timbri DNA dei controlli.....	32
A.3 Denaturazione di HPLC (DHPLC), Requisiti di sistema.....	33
A.4 Setup del laboratorio per dosaggi PCR .....	35
A.5 Bibliografia di riferimento .....	36
<b>Appendice B</b> .....	<b>37</b>
Guida alla risoluzione dei problemi .....	37
<b>Dettagli per gli Ordini</b> .....	<b>44</b>
<b>Dettagli di contatto</b> .....	<b>44</b>
<b>Traduzione Disclaimer</b> .....	<b>44</b>
<b>Licenze, Marchi e Copyright</b> .....	<b>45</b>

## 1 Produttore

Produttore		Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA Tel 1-402-452-5400.
Rappresentate CE		Transgenomic Limited 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, UK. Tel +44-141-892-8800.

## 2 CRC RAScan™ Combination Kit

### 2.1 Uso previsto

*Solo per uso professionale.* CRC RAScan Combination Kit di Transgenomic è un dosaggio diagnostico *in vitro* che rileva mutazioni somatiche negli Exons 2, 3 & 4 dei geni *KRAS* e *NRAS*. Tali mutazioni sono indicate dai picchi dei frammenti di taglio di SURVEYOR Nuclease e comprendono le mutazioni con importanza clinica potenziale nota. Il presente kit è destinato all'uso in laboratori diagnostici clinici da parte di personale opportunamente addestrato al test del DNA estratto da tessuti inclusi in paraffina e fissati in formalina.

Il numero di codice di questo kit è 710077. I manuali di istruzioni sono disponibili per il download dal sito:

<http://world.transgenomic.com/files/literature/482427-IT.pdf>.

### 2.2 Indicazioni per l'uso

CRC RAScan Combination Kit con sistemi DHPLC può essere utilizzato come ausilio nella valutazione della non risposta di pazienti con tumori coloretali, a trattamenti terapeutici con anti-EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico) quali il panitumumab.

CRC RAScan Combination Kit **non deve** essere utilizzato la diagnosi del tumore coloretale o di qualsiasi altra forma tumorale.

CRC RAScan Combination Kit è un dosaggio che rileva la presenza di potenziali mutazioni somatiche negli Exons 2, 3 & 4 dei geni *KRAS* e *NRAS* ma non conferma l'identità della sequenza della mutazione. **Per identificare l'esatta mutazione rilevata è necessario svolgere ulteriori analisi quali il sequenziamento del DNA.**

Sebbene i risultati dell'analisi con questi kit indicheranno lo stato di mutazione del paziente, è necessario tenere presente altri fattori clinici. I risultati ottenuti con CRC RAScan Combination Kit non devono essere l'unico metodo utilizzato per prendere decisioni in merito ad un potenziale trattamento a cui sottoporre pazienti affetti da tumore coloretale.

È importante sottolineare che l'uso di DHPLC per individuare i campioni positivi a una mutazione *KRAS* o *NRAS* va considerato solo a scopo indicativo e **tutte le mutazioni devono essere confermate mediante ulteriori analisi, ad esempio il sequenziamento del DNA.**

## 3 Principi del dosaggio di rilevamento della mutazione di CRC RAScan KRAS and NRAS

### 3.1 KRAS e NRAS

Agenti terapeutici in grado di interagire con il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) si sono dimostrati efficaci nel trattamento del tumore coloretale. Le ricerche hanno indicato che circa il 40% dei tumori coloretali evidenzia mutazioni somatiche del gene *KRAS* e studi clinici hanno dimostrato che le mutazioni dell'esone 2 *KRAS* (codoni 12 e 13) comportano una mancanza di risposta alle terapie anti-EGFR. Recenti studi esplorativi hanno dimostrato che la popolazione dei pazienti può essere definita in maniera più specifica come pazienti con tumori mCRC ospitanti un'ulteriore mutazione negli esoni 3 e 4 di *KRAS* o negli esoni 3 e 4 di *NRAS* e non tendenti a rispondere alla terapia contenente anti-EGFR<sup>1-7</sup>. Questo kit è studiato per l'analisi diagnostica delle mutazioni somatiche *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 & 4.

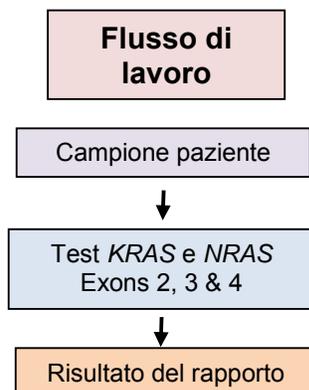
CRC RAScan Combination Kit è un dosaggio per il rilevamento dell'intera sequenza e di tutte le piccole mutazioni di inserzione/delezione negli Exons 2, 3 & 4 dei geni *KRAS* e *NRAS*. Le mutazioni dei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 di *KRAS* e *NRAS* sono state associate alla mancanza di efficacia del panitumumab. In questo kit sono forniti i Positive Control per le mutazioni dei codoni 12, 61, 117 e 146.

Il presente kit utilizza la tecnologia SURVEYOR Nuclease di proprietà di Transgenomic e, se associata alla tecnologia DHPLC System, garantisce una rilevazione semplice e sensibile delle potenziali mutazioni. È in grado di rilevare una miscela di DNA mutante al 2-5% su un background di DNA non mutante. Studi di convalida hanno dimostrato una concordanza estremamente elevata con il sequenziamento in campioni di tumore coloretale ben caratterizzati. L'uso di CRC RAScan Combination Kit riduce il ricorso al sequenziamento e al contempo agevola l'individuazione della mutazione anche laddove il software per il sequenziamento automatizzato non riesce a rilevare la presenza di una mutazione di basso livello.

Data l'alta sensibilità di questo dosaggio rispetto al sequenziamento Sanger, si consiglia di ottimizzare il set-up di laboratorio per evitare la contaminazione incrociata dei campioni o dei controlli. Per avere un esempio di un set-up di laboratorio ideale, vedere **Appendice A.4 Set-up di laboratorio per dosaggi PCR**.

### 3.2 Analisi di campioni paziente con i kit SURVEYOR Scan

L'uso di CRC RAScan Combination Kit è limitato al contesto di uno dei flussi di lavoro elencati di seguito.

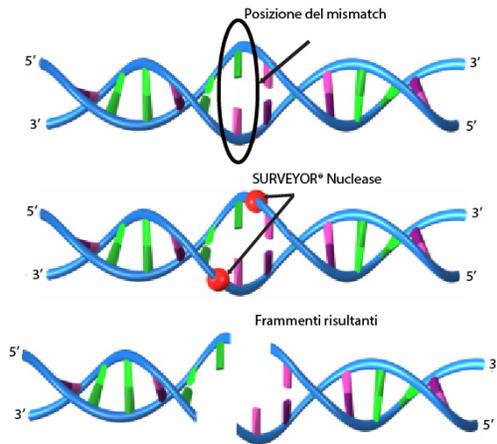


**Figura 1 Flusso di lavoro di CRC RAScan Combination Kit per lo screening di *KRAS* e *NRAS***

Per suggerimenti su come preparare piastre da 96 pozzetti per l'analisi di tutti i *KRAS* e *NRAS* Exons 2-4, ved. **Appendice A.1 Piano di layout della piastra per CRC RAScan Combination Kit**.

### 3.3 SURVEYOR Nuclease

SURVEYOR Nuclease di Transgenomic è una endonucleasi di DNA vegetale specifico del mismatch in grado di individuare mutazioni e polimorfismi noti e ignoti nel DNA eteroduplice<sup>8</sup>. L'enzima scinde il DNA con la sua elevata specificità in corrispondenza delle sedi di mismatch per la sostituzione di basi e altre alterazioni. Questa endonucleasi di DNA taglia entrambi i filamenti di un DNA eteroduplice sul lato 3' della sede di mismatch. Vengono riconosciuti tutti i mismatch di inserzione/delezione nonché i mismatch di sostituzione delle basi, ma l'efficacia di taglio varia a seconda della sequenza del mismatch.



**Figura 2. Modalità di azione della SURVEYOR Nuclease.**

L'endonucleasi riconosce il punto di mismatch e taglia dal lato 3' di ciascuna base del mismatch. In questo modo taglia il doppio filamento del DNA, lasciando sospesa una singola base 3'.

SURVEYOR Nuclease è stata impiegata in un'ampia gamma di contesti per rilevare con la massima precisione diverse mutazioni e polimorfismi nei geni. In particolare, SURVEYOR Nuclease è stata anche utilizzata per verificare la presenza di mutazioni note in diversi geni associati al tumore ai reni, ai polmoni, alla testa-collo, alla leucemia, al tumore dell'endometrio e nella selezione dei soggetti da sottoporre a radioterapia<sup>9,10,11</sup>.

CRC RAScan Combination Kit è stato studiato per tagliare i mismatch in *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 & 4 per la successiva analisi mediante DHPLC.

**Nota: se un campione è DNA mutante al 100%, non si possono formare eteroduplici e il campione risulterà "Wild-Type". Tuttavia, i campioni biotici tumorali conteranno cellule Wild-Type a causa dell'eterogeneità del tumore e/o del tessuto normale contaminante; va osservato che i campioni con DNA mutante al 5% e al 95% avranno cromatogramma identici.**

**Nota: per la parte PCR di questo dosaggio si consiglia l'uso della sola DNA Polymerase in dotazione con il presente kit.**

**Nota: attenersi alle istruzioni specifiche del manuale del sistema DHPLC.**

**Al fine di utilizzare al meglio il presente kit consigliamo vivamente di leggere attentamente il presente manuale e di attenersi scrupolosamente alle istruzioni e alle linee guida fornite. Chi si appresta per la prima volta all'utilizzo di questo kit è tenuto ad eseguire gli esperimenti di controllo illustrati nella sezione *Uso di DNA Plasmidici di Controllo*.**

Per qualsiasi domanda o richiesta di assistenza chiamare il numero (888) 233-9283 (solo Nord America), +1(402) 452-5400 oppure +44 (0) 141 892 8800 (Europa) e richiedere "KRAS and NRAS support". Oppure inviare un'e-mail all'indirizzo:

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

## 4 Tracciabilità dei controlli del kit

I controlli in dotazione al kit sono cloni plasmidici di sequenze di *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 & 4. Tutti i cloni sono stati sequenziati in modo da verificare la fedeltà della sequenza mediante confronto con NCBI Reference Sequences: NG\_007524.1 (*KRAS*) e NG\_007572 (*NRAS*).

I controlli hanno un “timbro” genetico. Ved. **Appendice A.2 Timbri DNA dei controlli**, si tratta di variazioni delle sequenze *KRAS* o *NRAS* Wild-Type in una regione in cui non sono previste mutazioni e possono essere usate per risolvere il problema della contaminazione dei campioni dai Positive Control. Ved. **Appendice B - Guida alla risoluzione dei problemi, Problema 8**, per l'esempio di un tracciato SURVEYOR Scan di tale contaminazione.

Il “**KRAS Control Wild-Type**” è stato realizzato mediante sintesi e clonazione degli Exons *KRAS* 2, 3 e 4 usando NCBI Reference Sequences NG\_007524.1.

Il “**KRAS Positive Control Exon 2**” è stato realizzato mediante sintesi dell'Exon 2 di *KRAS* usando la sequenza di riferimento summenzionata ma contenente la mutazione G12D. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 12 con un'alterazione G12D, GGT>GAT. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *KRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

Il “**KRAS Positive Control Exon 3**” è stato realizzato mediante sintesi dell'Exon *KRAS* 3 usando la sequenza di riferimento summenzionata ma contenente la mutazione Q61H. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 61 con un'alterazione Q61K, CAA>CAC. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *KRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

Il “**KRAS Positive Control Exon 4A**” è stato realizzato mediante sintesi dell'Exon *KRAS* 4 usando la sequenza di riferimento summenzionata ma contenente la mutazione K117N. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 117 con un'alterazione Q61K, AAA>AAT. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *KRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

Il “**KRAS Positive Control Exon 4B**” è stato realizzato mediante sintesi dell'Exon 4 di *KRAS* usando la sequenza di riferimento summenzionata ma contenente la mutazione A146T. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 146 con un'alterazione A146T, GCA>ACA. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *KRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

Il “**NRAS Control Wild-Type**” è stato realizzato mediante sintesi e clonazione degli Exons *NRAS* 2, 3 e 4 usando NCBI Reference Sequences NG\_007572.

Il “**NRAS Positive Control Exon 2**” è stato realizzato mediante sintesi dell'*NRAS* Exon 2 usando il riferimento di cui sopra ma contenente la mutazione G12D. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 12 con un'alterazione G12D, GGT>GAT. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *NRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

Il “**NRAS Positive Control Exon 3**” è stato realizzato mediante sintesi dell' *NRAS* Exon 3 usando la sequenza di riferimento summenzionata ma contenente la mutazione Q61K. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 61 con un'alterazione Q61K, CCA>AAA. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *NRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

Il “**NRAS Positive Control Exon 4**” è stato realizzato mediante sintesi dell'Exon 4 di *NRAS* usando la sequenza di riferimento summenzionata ma contenente la mutazione A146T. Il sequenziamento del DNA ha confermato che l'unica modifica alla sequenza si ha in corrispondenza del codone 146 con un'alterazione A146T, GCC>ACC. Questo clone viene quindi miscelato con DNA *NRAS* Control Wild-Type per creare una miscela eterozigote.

## 5 Componenti

CRC RAScan Combination Kit viene fornito in una confezione singola con due scatole separate: (a) una scatola di reagenti per l'analisi di *KRAS* Exons 2, 3 & 4 e (b) una scatola di reagenti per l'analisi di *NRAS* Exons 2, 3 & 4. Nell'insieme le scatole contengono una quantità di reagenti sufficiente per eseguire le analisi elencate nella sezione 5.3.

### 5.1 Scatola SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 (REF 710107)

La scatola con i componenti per l'analisi di *KRAS* Exons 2, 3 & 4 contiene due confezioni interne: (1) una **confezione di componenti di digestione SURVEYOR** con 10 provette di reagenti e (2) un **portaprovette di componenti e controlli PCR** esterno contenente 20 provette di reagenti.

Numero di codice	Componente	Colore tappo provetta	Kit da 130 reazioni Volume fornito
<b>Confezione di componenti di digestione SURVEYOR</b>			
710160	SURVEYOR Nuclease W	Viola	3 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Nero	2 x 105 µL
708049	Cofattore SURVEYOR Enhancer	Rosa	2 x 105 µL
708027	Soluzione 0,15 M di MgCl <sub>2</sub>	Marrone	2 x 105 µL
708030	Soluzione di arresto	Rosso	250 µL
<b>Confezione di componenti e controlli PCR</b>			
703310	DNA Polymerase	Trasparente	2 x 100 µL
703315	10x DNA Polymerase Reaction Buffer	Trasparente	1 mL
703065	dNTPs (10 mM)	Trasparente	2 x 500 µL
710155F	<i>KRAS</i> Primer: Exon 2 Forward (10 µM)	Blu	125 µL
710155R	<i>KRAS</i> Primer: Exon 2 Reverse (10 µM)	Blu	125 µL
710157F	<i>KRAS</i> Primer: Exon 3 Forward (10 µM)	Blu	90 µL
710157R	<i>KRAS</i> Primer: Exon 3 Reverse (10 µM)	Blu	90 µL
710154F	<i>KRAS</i> Primer: Exon 4A Forward (10 µM)	Blu	90 µL
710154R	<i>KRAS</i> Primer: Exon 4A Reverse (10 µM)	Blu	90 µL
710156F	<i>KRAS</i> Primer: Exon 4B Forward (10 µM)	Blu	90 µL
710156R	<i>KRAS</i> Primer: Exon 4B Reverse (10 µM)	Blu	90 µL
710131	<i>KRAS</i> Control Wild-Type	Giallo	120 µL
710135	<i>KRAS</i> Positive Control Exon 2	Verde	40 µL
710136	<i>KRAS</i> Positive Control Exon 3	Verde	40 µL
710137	<i>KRAS</i> Positive Control Exon 4A	Verde	40 µL
710138	<i>KRAS</i> Positive Control Exon 4B	Verde	40 µL
710153F	Universal Sequencing Primer 1 (10 µM)	Arancione	125 µL
710153R	Universal Sequencing Primer 2 (10 µM)	Arancione	125 µL

## 5.2 Scatola SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 (REF 710400)

La scatola con i componenti per l'analisi di *NRAS* Exons 2, 3 & 4 contiene due confezioni interne: (1) una **confezione di componenti di digestione SURVEYOR** con 10 provette di reagenti senza fori vuoti e (2) un **portaprovette di componenti e controlli PCR** esterno contenente 14 provette di reagenti.

Numero di codice	Componente	Colore tappo provetta	Kit da 100 reazioni Volume fornito
<b>Confezione di componenti di digestione SURVEYOR</b>			
710160	SURVEYOR Nuclease W	Viola	2 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Nero	105 µL
708049	Cofattore SURVEYOR Enhancer	Rosa	105 µL
708027	Soluzione 0,15 M di MgCl <sub>2</sub>	Marrone	105 µL
708030	SURVEYOR Stop Solution	Rosso	250 µL
710153F	Universal Sequencing Primer 1 (10 µM)	Arancione	2 x 125 µL
710153R	Universal Sequencing Primer 2 (10 µM)	Arancione	2 x 125 µL
<b>Confezione di componenti e controlli PCR</b>			
703310	DNA Polymerase (250 U)	Rosso	100 µL
703312	DNA Polymerase (50 U)	Rosso	20 µL
703315	DNA Polymerase 10X tampone PCR	Trasparente	1 mL
703065	dNTPs (10 mM)	Trasparente	500 µL
710452F	<i>NRAS</i> Primer Exon 2 Forward (10 µM)	Blu	90 µL
710452R	<i>NRAS</i> Primer Exon 2 Reverse (10 µM)	Blu	90 µL
710453F	<i>NRAS</i> Primer Exon 3 Forward (10 µM)	Blu	90 µL
710453R	<i>NRAS</i> Primer Exon 3 Reverse (10 µM)	Blu	90 µL
710454F	<i>NRAS</i> Primer Exon 4 Forward (10 µM)	Blu	90 µL
710454R	<i>NRAS</i> Primer Exon 4 Reverse (10 µM)	Blu	90 µL
710441	<i>NRAS</i> Control Wild-Type Mix	Giallo	120 µL
710442	<i>NRAS</i> Positive Control Exon 2	Verde	40 µL
710443	<i>NRAS</i> Positive Control Exon 3	Verde	40 µL
710444	<i>NRAS</i> Positive Control Exon 4	Verde	40 µL

## 5.3 Numero di Campioni Analizzabili con un Kit

CRC *RAScan* Combination Kit consente l'analisi di 230 reazioni. Il numero totale di campioni analizzabili con il kit dipende dalle dimensioni medie del lotto di campioni da testare in ogni dato momento, poiché un set di reazioni di controllo (Wild-Type Control, Positive Control e Controllo privo di template) deve essere incluso in ogni piastra di reazioni. La tabella seguente riporta il numero di campioni che possono essere analizzati con il kit *KRAS* e *NRAS* a seconda delle dimensioni medie del lotto. Il calcolo tiene conto del fatto che (a) per ogni analisi sono necessari 21 controlli (7x Wild-Type, 7x Positive Controls, 7x Controllo privo di template) e che (b) ciascun kit ha un limite di 230 reazioni.

**Nota:** se vengono eseguite più piastre, ogni set dei 21 controlli elencati sopra deve trovarsi sulla piastra. Pertanto due piastre richiedono in totale 42 reazioni di controlli; 3 piastre richiedono 63 reazioni di controlli, ecc.

Aumentando le dimensioni del lotto aumenta anche il numero di campioni analizzabili con un unico kit, con conseguente riduzione del costo medio del reagente per campione. La tabella che segue è una guida al numero di campioni che possono essere testati con i kit.

Dimensioni del lotto	Numero di reazioni di controlli + Numero di ampliconi campioni	Numero di reazioni richieste per analisi	Analisi totali lotto campioni per Kit	Campioni testati per kit
1	21 + 7	28	8	8
2	21 + 14	35	6	12
3	21 + 21	42	5	15
4	21 + 28	49	4	16
5	21 + 35	56	4	20

#### 5.4 Sequenziamento del DNA

Sono forniti primer di sequenziamento (N° di catalogo [PN] 710153F e 710153R) da utilizzare per il sequenziamento del DNA di tutti i campioni testati. Per il sequenziamento si consiglia di utilizzare gli ampliconi ottenuti tramite PCR prima della digestione con SURVEYOR Nuclease .

## 6 Apparecchiature e reagenti aggiuntivi richiesti

Per l'utilizzo del CRC RAScan Combination Kit con DHPLC sono richieste le seguenti apparecchiature e componenti aggiuntivi:

- sistema DHPLC , colonna, tamponi, dimensione standard DNA
  - ved. **Appendice A.3.1 DHPLC Requisiti per applicazioni SURVEYOR Scan** per le caratteristiche di un sistema DHPLC adatto all'uso con questo kit
- Acqua per uso in biologia molecolare
- Provette da 0,2 mL-PCR, strisce o piastra da 96 pozzetti
- Micropipettatori
- Puntali delle pipette
- Bagno di ghiaccio
- Miscelatore vortex
- Microcentrifuga
- Termociclatore
- Gel di agarosio e apparecchiature per elettroforesi in gel di agarosio
- Candeggina al 10% o detergente simile

## 7 Preparazione del reagente

Tutti i reagenti forniti in dotazione con questo kit sono pronti per l'uso. Alcuni componenti devono essere scongelati, agitati con il vortex o centrifugati in una microcentrifuga prima dell'uso; verificare i dettagli nella sezione **Procedura di dosaggio** più avanti. I reagenti devono essere mescolati per ottenere la Master Mix e le miscele di reazione; tutti i dettagli sono forniti nella sezione **Procedura di dosaggio** di seguito.

## 8 Conservazione e Durata

Prima dell'uso conservare il kit ad una temperatura compresa tra -18 °C e -25 °C in un congelatore a temperatura costante. Prendere nota della data di scadenza di ciascun kit ricevuto. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza indicata.

La miscela SURVEYOR Nuclease preparata come descritto al punto 7 della ***Digestione con SURVEYOR Nuclease*** deve essere utilizzata **subito** in quanto la SURVEYOR Nuclease W nel tempo si inattiva per la presenza degli altri componenti della miscela di reazione di SURVEYOR Nuclease .

## 9 Avvertenze e precauzioni

Nessuno dei reagenti presenti nel kit rappresenta un pericolo per la salute nelle quantità fornite. Scaricare la scheda di sicurezza Transgenomic MSD-710077 dal sito

<http://world.transgenomic.com/files/literature/710077-IT.pdf>

Il presente kit non contiene sostanze di origine animale o umana che costituiscano un potenziale rischio di infezione.

L'uso del presente kit è riservato a persone adeguatamente preparate nell'applicazione delle tecniche di laboratorio richieste. Quando si maneggiano i componenti del kit, indossare sempre un apposito camice da laboratorio, guanti monouso e una protezione per gli occhi. Dopo l'uso smaltire i componenti del kit come rifiuti clinici nel rispetto delle regole e delle vigenti normative locali.

Le aliquote di reagenti pipettate dalle provette del kit sono solo monouso. È stato verificato che i componenti del kit restano stabili per 25 cicli di congelamento/scongelo. Non utilizzare il kit qualora si sia superato il numero di cicli di congelamento - scongelamento.

## 10 Raccolta, manipolazione e conservazione del campione

CRC RAScan Combination Kit è stato convalidato per l'uso con DNA estratto da campioni di tumore coloretale inclusi in paraffina e fissati in formalina (FFPE). Affinché l'estrazione del DNA sia ottimale, il tessuto deve essere fissato in formalina per 14–24 ore prima dell'inclusione in paraffina.

I campioni biotipici di tumore sono una miscela eterogenea di cellule tumorali e non tumorali. Inoltre, il tumore stesso è costituito da un mix eterogeneo di cellule tumorali **con** mutazioni e cellule tumorali **senza** mutazioni. Poiché queste mutazioni somatiche possono non essere uniformemente distribuite all'interno del tumore, la risultante analisi mutazionale di differenti sezioni dello stesso tumore può essere diversa. Per aumentare la probabilità di rilevare una mutazione, il DNA della regione tumorale del tessuto deve essere isolata raschiando solo l'area tumorale dal vetrino usando un nuovo scalpello sterile per ogni nuovo vetrino.

Per un utilizzo efficace del kit, il DNA estratto deve soddisfare i criteri elencati al paragrafo ***Considerazioni sul Templato***.

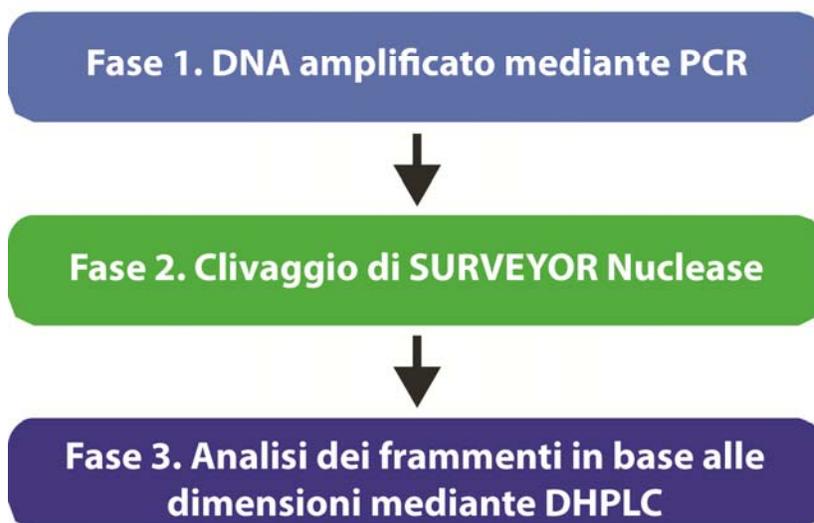
**NOTA:** I campioni di DNA estratto non destinati all'analisi immediata con il kit devono essere conservati da -20 °C a -80 °C.

## 11 Procedura di dosaggio

### 11 Rilevamento di una Mutazione Somatica con i Kit SURVEYOR Scan – Considerazioni Generali

Il rilevamento di una mutazione e la successiva conferma con SURVEYOR Nuclease si articola in tre fasi:

## Pre-screening con SURVEYOR Scan in tre passaggi diretti



**Fase 1** - Preparazione degli ampliconi per PCR da DNA mutante (test) e normale (riferimento). Dopo il ciclo di amplificazione PCR finale la reazione viene riscaldata per denaturare ed aprire tutti i doppi filamenti e poi raffreddata lentamente in modo da garantire una formazione ottimale di etero- e omoduplici (gli eteroduplici si formano quando un filamento di sequenza Wild-Type si accoppia con un filamento di sequenza mutante).

**Fase 2** - Trattamento della miscela eteroduplice/omoduplice così ottenuta con SURVEYOR Nuclease. SURVEYOR Nuclease taglia entrambi i filamenti del DNA eteroduplice dando origine a frammenti di DNA. Il DNA Control Wild-Type, trattato in modo simile, funge da controllo.

**Fase 3** - Analisi dei frammenti di DNA su un sistema DHPLC. La formazione dei nuovi prodotti, dovuti alla presenza di uno o più mismatch, è indicata dalla presenza di altri picchi cromatografici. I tempi di migrazione dei prodotti di taglio sono correlati alle dimensioni dei frammenti e pertanto indicano la posizione approssimativa del/dei mismatch.

## 12 Istruzioni dettagliate

### 12.1 Configurazione/calibrazione INIZIALE di DHPLC

Per l'impostazione della piastra SURVEYOR Nuclease per l'analisi mediante DHPLC, consultare l'**Appendice A.3 Denaturazione di HPLC (DHPLC, Requisiti di sistema)**.

### 12.2 Considerazioni prima dell'Analisi del Campione *KRAS* e *NRAS*

Prima dell'analisi dei campioni su un sistema DHPLC, deve essere eseguito il DNA Size Standard adeguato per verificare che il sistema funzioni correttamente. Il personale di laboratorio che utilizza lo strumento deve controllare la qualità della risoluzione del DNA Size Standard prima di procedere all'analisi.

### 12.3 Considerazioni sul template

1. Per il template di DNA ottenuto mediante FFPE utilizzare le normali procedure di laboratorio per valutare la qualità e la quantità di DNA estratto accertandosi che vi sia una quantità di template sufficiente per la PCR.
2. Il rapporto di assorbanza 260/280 deve essere maggiore di 1,80.
3. Per velocizzare la messa a punto della PCR è necessario che la concentrazione del template di lavoro sia di circa 12,5 ng/μL. Se necessario, diluire il template di DNA con acqua per uso in biologia molecolare.

### 12.4 Considerazioni sul flusso di lavoro

Il kit è stato concepito per consentire l'analisi su 230 reazioni. È possibile eseguire lotti più piccoli, ma per ciascun lotto è necessario includere i controlli del kit e un controllo NTC ("no template control", controllo privo di template). Il kit contiene un quantitativo sufficiente di materiali di controllo per 230 reazioni per tutte le combinazioni di lotti di campione di differente entità.

In linea generale, l'elaborazione dei campioni deve essere eseguita dall'inizio alla fine come descritto nel presente Manuale di istruzioni. Se l'elaborazione di un campione viene interrotta prima del completamento di tutte le fasi, è necessario conservare il DNA a -20 °C nei punti indicati. Tuttavia, si consiglia di evitare l'esposizione di qualsivoglia campione congelato a più cicli di congelamento/scongelo e la conservazione (da -18 a -25 °C) di campioni di DNA amplificato mediante PCR o prodotti della digestione con SURVEYOR Nuclease per periodi di tempo prolungati (>1 settimana).

L'analisi dei campioni deve seguire la sequenza illustrata di seguito:

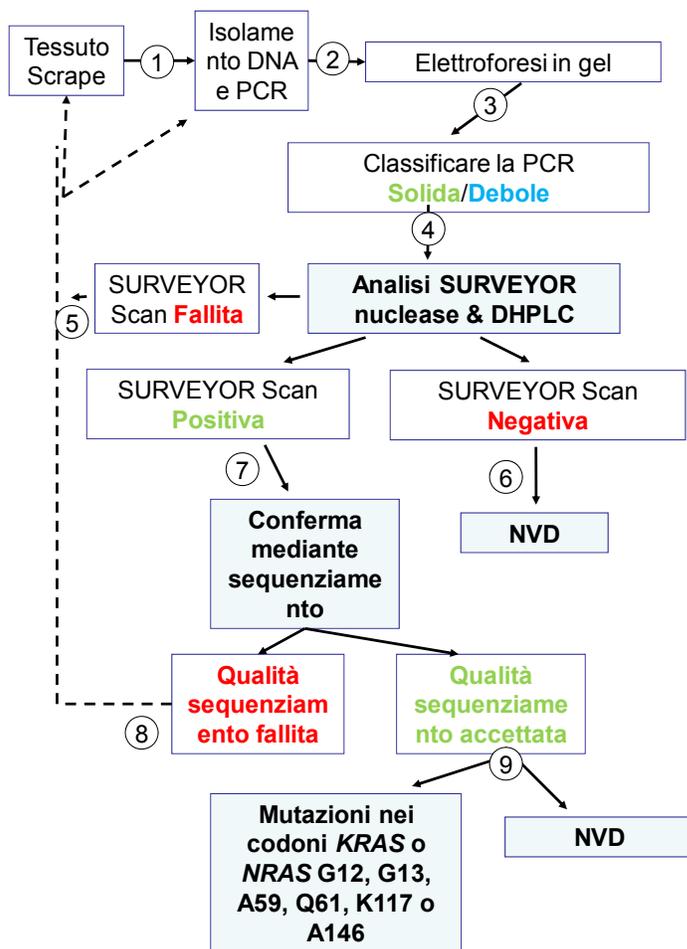


Figura 3: Flusso di lavoro dell'analisi CRC RAScan Combination Kit

### Note alla Figura 3

1. Isolare il DNA da FFPE utilizzando procedure di laboratorio standard.
2. Eseguire PCR e controllare la qualità del DNA con elettroforesi in gel.
3. Registrare se la banda PCR è **solida** ( $\geq 20$  ng/ $\mu$ L) o **debole** ( $< 20$  ng/ $\mu$ L).

**Se sono presenti bande PCR multiple preparare DNA genomico fresco da FFPE.**

4. Con i campioni classificati come **PCR solida** o **PCR debole** in seguito ad amplificazione PCR, procedere al trattamento SURVEYOR Nuclease e all'analisi del sistema DHPLC.

**Si noti che con un risultato debole per PCR, il DNA potrebbe essere insufficiente per la produzione di risultati affidabili da DHPLC, sebbene possa essere sufficiente per il sequenziamento.**

5. Ved. **Appendice B – Guida alla risoluzione dei problemi** per esempi di risultati SURVEYOR Scan falliti. Tutti i campioni con risultato SURVEYOR Scan non riuscito devono essere nuovamente elaborati in uno dei seguenti modi:
  - a. ripetendo la PCR se rimane sufficiente DNA genomico
  - b. riestraendo il DNA dalla FFPE; questa è da considerarsi come opzione di seconda scelta in quanto è di norma poco auspicabile tagliare un altro blocco FFPE .
  - c. se vengono usati una sezione o un blocco diversi, occorre ripetere l'intero dosaggio in quanto le discrepanze nelle digestioni possono essere dovute all'eterogeneità del tumore.
6. Se non sono presenti picchi dei frammenti di taglio visibili, registrare un risultato SURVEYOR Scan negativo, ossia NVD (No Variant Detected) = nessuna variante individuata.
7. Se un campione mostra prodotti di clivaggio di SURVEYOR Nuclease (non corrisponde al relativo Wild-Type Control) questi devono essere sottoposti a conferma mediante sequenziamento.
8. Se l'analisi con conferma mediante sequenziamento è inaccettabile, procedere in uno dei seguenti modi:
  - a. ripetere la PCR se rimane sufficiente DNA genomico
  - b. riestrarre il DNA dalla FFPE; questa è da considerarsi come opzione di seconda scelta in quanto è di norma poco auspicabile tagliare un altro blocco FFPE .
9. Se l'analisi con conferma mediante sequenziamento è accettabile, i risultati devono indicare uno dei seguenti:
  - a. Sequenza Wild-Type ovvero, Nessuna variante individuata (NVD); oppure
  - b. Variante individuata. Se la conferma mediante sequenziamento indica un'alterazione di una base con conseguente modifica negli aminoacidi a livello del:
    - i. codoni 12 o 13
    - ii. codone 59 o 61
    - iii. codone 117; o
    - iv. codone 146

classificare come mutazione *KRAS* o *NRAS* positiva.

**Nota:** è possibile avere un risultato SURVEYOR Scan positivo, che porti anch'esso a un valore "Nessuna variante identificata" dalla conferma mediante sequenziamento. Il livello di rilevamento (Level of detection, LOD) di SURVEYOR Nuclease su un sistema DHPLC è del 2% di mutazione a fronte di un DNA Wild-Type del 98% per alcune mutazioni, mentre l'LOD del sequenziamento è di circa il 10-25% di mutazione a fronte di un DNA Wild-Type .

**Nota:** se un campione è DNA mutante al 100%, non si possono formare eteroduplici e il campione risulterà "Wild-Type". Tuttavia, i campioni biotici tumorali conterranno cellule Wild-Type a causa della eterogeneità del tumore e/o del tessuto normale contaminante.

**Nota:** campioni con DNA mutante al 5% e al 95% avranno cromatogramma identici.

**Nota:** risultati SURVEYOR Scan positivi possono essere dovuti ad alterazioni di basi diverse da quelle che sono state riscontrate *KRAS*- o *NRAS*-attivanti. Sebbene queste mutazioni siano rare, sarà necessaria la conferma con un altro metodo, come il sequenziamento del DNA, per determinare se un risultato SURVEYOR Scan positivo è o meno una mutazione *KRAS*-o *NRAS*-attivante.

**Nota:** il processo di fissazione in formalina usato per preparare i campioni biotici tumorali FFPE può provocare la deaminazione delle citosine, che converte la citosina in uracile. La polimerasi "interpreta" questo uracile come timina e integra un'adenina nei filamenti copiati. Quindi, ciò apparirà come una mutazione in cui la normale G è sostituita da una A provocando una mutazione da GC in AT, che costituisce una mutazione artefatta dovuta al processo di fissazione e non una reale mutazione somatica. Si tratta di eventi rari, ma se la copia avviene in una fase precoce del ciclo PCR, possono "assomigliare" a mutazioni. Non si ripetono alla rianalisi.

Esempi di potenziale mutazione di deaminazione della citosina che sarebbero presi in considerazione nel determinare il trattamento cui sottoporre il paziente sono per *KRAS*:

- Codone 12: AGT (G12S) e GAT (G12D)
- Codone 13: AGC (G13S), GAC (G13D) e GGT (G13G, una mutazione silente)
- Codone 146: GCA>ACA (A146T)

Esempi di potenziale mutazione di deaminazione della citosina che sarebbero presi in considerazione nel determinare il trattamento cui sottoporre il paziente sono per *NRAS*:

- Codone 12: GGT> AGT (G12S) o GAT (G12D)
- Codone 13: GGT> AGT (G13S), GAT (G13D) o GGC (G13G, una mutazione silente)
- Codone 146: GCC>ACC (A146T)

Pertanto, si consiglia di confermare tali mutazioni mediante la doppia analisi dello stesso DNA genomico o sottoponendo tutti i campioni a doppia analisi sin dall'inizio.

## 12.5 Protocollo di amplificazione

1. Le soluzioni Transgenomic premixate di dNTP (PN 703065 e 705020) vengono fornite ad una concentrazione operativa totale in deossinucleotide di 10 mM (2,5 mM di ciascuno dei quattro deossinucleotidi).
2. Il primer *KRAS* e *NRAS* Forward e Reverse PCR (*KRAS* PN 710155F/R, 710157F/R, 710154F/R e 710156F/R; *NRAS* PN 710452F/R, 710453F/R e 710454F/R) vengono forniti a 10 µM.
3. Prelevare dal congelatore 10 µM di primer, 10 mM di soluzione dNTP e DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) e scongelare su ghiaccio.
4. Dopo lo scongelamento, agitare nel vortex tutti i componenti del kit per ~ 10 secondi, al fine di miscelare accuratamente, centrifugare brevemente per ~ 10 secondi, per assicurarsi che sui coperchi delle provette non rimanga liquido, quindi collocare su ghiaccio.
5. Preparare le Master Mix su ghiaccio.

6. Utilizzare la seguente tabella come guida per la preparazione della Master Mix per **ciascuna** delle reazioni *KRAS* Exon 2, *KRAS* Exon 3, *KRAS* Exon4A, *KRAS* Exon 4B, e delle reazioni *NRAS* Exon 2, *NRAS* Exon 3 e *NRAS* Exon 4:

<b>Numero di reazioni (7 campioni + 3 controlli):</b>	<b>10</b>
<b>Calcolo del volume:</b>	
Volume dell'acqua (µL)	<b>330**</b>
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	50
dNTPs (µL)	40
Forward Primer (µL)	25
Reverse Primer (µL)	25
DNA Polymerase (µL)	10
<b>Volume totale della Master Mix</b>	<b>48,0</b>

**\*\*Nota: L'operatore deve prefiggersi di avere minimo 25 ng di DNA per 50 µL di reazione PCR.** Se le concentrazioni di DNA estratto sono inferiori a 12,5 ng/µL, aumentare proporzionalmente il volume di DNA estratto per assicurare 25 ng per reazione. Ridurre inoltre il volume di acqua nella Master Mix in uguale quantità per produrre 50 µL per reazione. **In tutti i campioni preparati con queste master mix sarà necessario diluire il DNA estratto fino a circa lo stesso livello di concentrazione minima.** Si sconsiglia l'uso di concentrazioni di DNA estratto inferiori a 5 ng/µL.

7. Calcolare i volumi richiesti per ogni Master Mix facendo riferimento al grafico precedente; va osservato che:
- Per la Master Mix 1, *KRAS* Exon 2,** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni: *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 2 e *KRAS* Exon 2 Controllo privo di template (NTC1).
  - Per la Master Mix 2, *KRAS* Exon 3,** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni: *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 3 e *KRAS* Exon 3 Controllo privo di template (NTC2).
  - Per la Master Mix 3, *KRAS* Exon 4A** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni: *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 4A e *KRAS* Exon 4A Controllo privo di template (NTC3).
  - Per la Master Mix 4, *KRAS* Exon 4B** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni: *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 4B e *KRAS* Exon 4B Controllo privo di template (NTC4).
  - Per la Master Mix 5, *NRAS* Exon 2** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni per *NRAS* Control Wild-Type, *NRAS* Positive Control Exon 2 e *NRAS* Exon 2 Controllo privo di template (NTC5).
  - Per la Master Mix 6, *NRAS* Exon 3** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni per *NRAS* Control Wild-Type, *NRAS* Positive Control Exon 3 e *NRAS* Exon 3 Controllo privo di template (NTC6).
  - Per la Master Mix 7, *NRAS* Exon 4** saranno necessarie tre reazioni supplementari per piastra di campioni per *NRAS* Control Wild-Type, *NRAS* Positive Control Exon 4 e *NRAS* Exon 4 Controllo privo di template (NTC7).

**Nota: si tenga presente che, per compensare le perdite durante la pipettatura, sarà richiesto un volume della Master Mix leggermente superiore a quello risultante da questo calcolo.**

- Etichettare le provette per PCR da 0,2 mL (o i pozzetti della piastra da 96 pozzetti) con adeguate informazioni sui campioni.
- Etichettare una provetta per centrifuga da 2,0 mL per la preparazione della Master Mix.
- Aggiungere il volume richiesto di acqua per uso in biologia molecolare nelle provette da 2,0 mL destinate alla "Master Mix".

11. Aggiungere il quantitativo richiesto di DNA Polymerase 10X PCR Buffer nelle provette della Master Mix.
12. Aggiungere il volume richiesto di 10 mM dNTP nelle provette della Master Mix.
13. Aggiungere il volume richiesto di *KRAS* o *NRAS* Forward Primer nelle rispettive provette della Master Mix.
14. Aggiungere il volume richiesto di *KRAS* o *NRAS* Reverse Primer nelle rispettive provette della Master Mix.
15. Prelevare la DNA Polymerase (PN 703310) dal congelatore.
16. Centrifugare la DNA Polymerase per ~10 secondi.
17. Agitare nel vortex la DNA Polymerase per ~10 secondi.
18. Aggiungere il volume richiesto di DNA Polymerase nelle provette della Master Mix.
19. Chiudere le provette della Master Mix.
20. Prima dell'uso, agitare nel vortex le provette della Master Mix per ~30 e quindi centrifugare brevemente per ~10 secondi.
21. Conservare su ghiaccio fino al momento di utilizzo.
22. Pipettare 48,0 µL (vedere nota al punto 6) di Master Mix negli appositi pozzetti, sostituendo i puntali in caso di utilizzo di una pipetta a singolo canale. In caso di utilizzo di una pipetta a ripetizione, accertarsi che non vi siano fuoriuscite/spruzzi da un pozzetto all'altro. Conservare la piastra su ghiaccio.
23. Aggiungere negli appositi pozzetti 2,0 µL (vedere nota al punto 6) di ciascun template di DNA o acqua (no template control, NTC). Usare puntali delle pipette separati per ciascun campione per evitare la contaminazione incrociata a causa di schizzi. Coprire i pozzetti contenenti i DNA campione e il NTC con strip da 8 tappi (nel caso si utilizzi una piastra da 96 pozzetti) oppure chiudere con il tappo le provette per PCR da 0,2 mL. Accertarsi che i tappi siano ermeticamente ben chiusi.
24. Solo a questo punto aprire le provette del template di DNA di controllo del kit (PN 710131, 710135, 710136, 710137, 710138, 710441, 710442, 710443 e 710444) una alla volta. Pipettare per ultimi 2,0 µL di ciascun template di controllo al fine di ridurre le probabilità di contaminazione di qualsivoglia DNA campione. Nuovamente, coprire ciascun pozzetto con strip da 8 tappi (nel caso si utilizzi una piastra da 96 pozzetti) oppure chiudere con il tappo le provette per PCR da 0,2 mL. Accertarsi che i tappi siano ermeticamente ben chiusi.  
**NOTA:** è buona prassi inserire i controlli NTC nei pozzetti non adiacenti ai Positive Control o ai campioni.  
**NOTA:** per suggerimenti su come preparare piastre da 96 pozzetti per l'analisi di tutti gli esoni *KRAS* e *NRAS* 2-4 2-4 ved. **Appendice A.1 Piano di layout della piastra per kit SURVEYOR Scan**.
25. Agitare in vortex (a ~ 1/2 velocità) per 10 sec.
26. Centrifugare per 1-2 minuti per assicurare che tutte le soluzioni si raccolgano alla base dei pozzetti o delle provette. Verificare che tutte le soluzioni si trovino sul fondo di ciascun pozzetto o di ciascuna provetta. In caso contrario, ripetere la centrifugazione.

## 12.6 Programma del termociclatore per il protocollo di amplificazione

1. Per l'amplificazione PCR e la formazione di eteroduplici utilizzare il seguente protocollo del termociclatore:

Denaturazione iniziale		
	95 °C	5 minuti
Amplificazione touchdown		
15 cicli	95 °C	30 secondi
	62 °C, -0,5 °C/ciclo	30 secondi
	72 °C	25 secondi
Amplificazione		
30 cicli	95 °C	30 secondi
	55 °C	30 secondi
	72 °C	25 secondi
Estensione finale		
1 ciclo	72 °C	2 minuti
Formazione di eteroduplici		
	95 °C	2 minuti
	≤12 °C	In attesa

## 12.7 Controllo qualità di prodotti PCR

1. Si consiglia di controllare la qualità e la quantità degli amplicone mediante elettroforesi su gel (o metodi equivalenti) prima di passare alla digestione con SURVEYOR Nuclease .
2. Analizzare un'aliquota del prodotto PCR insieme ad altri diversi quantitativi di un DNA mass ladder da 100 coppie di basi.
3. Utilizzare il ladder per determinare la concentrazione del DNA amplificato.
4. Si dovrebbe ottenere un'unica banda con concentrazione maggiore di 20 ng/μL corrispondente al prodotto di PCR principale.
5. In presenza di più bande, verificare che la qualità del template di DNA inserito sia stata sufficiente (ved. **Appendice B – Guida alla risoluzione dei problemi**).
6. In assenza di un qualche prodotto, verificare che la qualità del template di DNA inserito sia stata sufficiente (ved. **Appendice B – Guida alla risoluzione dei problemi**). Se la qualità era soddisfacente, aumentare il volume di template a 4,0 μL per 50 μL di reazione (ridurre l'acqua per reazione a 31,0 μL).
7. Nel campione di controllo stampo non dovrebbero essere visibili prodotti PCR. In presenza di prodotti di DNA in questo controllo, è probabile una contaminazione; ved. **Appendice B - Guida alla risoluzione dei problemi**.
8. Classificare la PCR come solida o debole.
  - a. Una PCR solida deve avere una banda singola maggiore o uguale a 20 ng/μL.
  - b. Una PCR debole deve avere una banda singola inferiore a 20 ng/μL.
  - c. Passare alla digestione SURVEYOR Nuclease con i risultati PCR sia "solidi" che "deboli".



**Suggerimento: in questa fase i prodotti PCR possono essere conservati a temperature non superiori a -20 °C per una settimana al massimo.**

## 12.8 Digestione di SURVEYOR Nuclease

- Una volta ritenute sufficienti la qualità e la quantità del campione PCR, procedere alla reazione di digestione di SURVEYOR Nuclease come descritto di seguito. È necessaria una concentrazione del campione superiore o pari a 40 ng/μL per una digestione ottimale da SURVEYOR Nuclease.
- Scongelare su ghiaccio le provette contenenti 0,15 M MgCl<sub>2</sub> Solution e SURVEYOR Enhancer Cofactor.
- Aggiungere 10,0 μL di ciascun campione amplificato tramite PCR come descritto sopra in una nuova provetta da 0,2 mL PCR o in un pozzetto della piastra da 96 pozzetti.
- Preparare una miscela di 0,15 M MgCl<sub>2</sub> Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 e SURVEYOR Nuclease W (miscela SURVEYOR Nuclease).

Utilizzare la seguente tabella come guida per la preparazione di una SURVEYOR Nuclease Master Mix di Digestione per l'analisi di più campioni. L'esempio seguente prevede i volumi per una Master Mix da 10 campioni.

Si tenga presente che, per compensare le perdite durante la pipettatura, sarà richiesto un volume della Master Mix leggermente superiore a quello risultante da questo calcolo.

Numero di reazioni di SURVEYOR Nuclease Digest:	10
<b>Calcolo del volume:</b>	
0,15 M MgCl <sub>2</sub> Solution (μL)	10,0
SURVEYOR Enhancer Cofactor (μL)	10,0
SURVEYOR Enhancer W2 (μL)	10,0
SURVEYOR Nuclease W (μL)	20,0
<b>Volume totale della Master Mix:</b>	<b>50,0</b>
Aggiungere <b>5 μL</b> di SURVEYOR Nuclease Master Mix a campione amplificato PCR (μL)	10,0
<b>Volume totale reazione di digestione SURVEYOR Nuclease :</b>	<b>15,0</b>

- Centrifugare ciascun reagente prima dell'uso.
- Agitare delicatamente nel vortex ciascun reagente prima della pipettatura; centrifugare brevemente per ~10 secondi dopo ciascuna fase di vortex.
- Per ciascuna reazione di digestione aggiungere i seguenti componenti in una provetta per microcentrifuga da 0,2 ml (o più grande).
  - 1,0 μL 0,15 M MgCl<sub>2</sub> Solution (PN 708027)
  - 1,0 μL SURVEYOR Enhancer Cofactor (PN 708049)
  - 1,0 μL SURVEYOR Enhancer W2 (PN 710161)
  - 2,0 μL SURVEYOR Nuclease W (PN 710160)

Oppure, aggiungere 5 μL della Master Mix preparata come indicato nella tabella precedente.

- Agitare delicatamente nel vortex la Master Mix di SURVEYOR Nuclease per 10 secondi a bassa velocità
- Centrifugare la Master Mix di SURVEYOR Nuclease per 10 secondi a bassa velocità.
- Porre la Master Mix di digestione di SURVEYOR Nuclease su ghiaccio fino al momento dell'uso.

**Nota: La Master Mix di Digestione di SURVEYOR Nuclease preparata come descritto al punto 7 deve essere utilizzata subito in quanto la SURVEYOR Nuclease W nel tempo si inattiva per la presenza degli altri componenti della miscela.**

- Pipettare l'aliquota da 5,0 μL della Master Mix di Digestione di SURVEYOR Nuclease in ciascuna provetta o pozzetto contenente l'aliquota da 10,0 μL di prodotto PCR amplificato (punto 3 di cui sopra).

9. Al termine della pipettatura, centrifugare le provette per PCR da 0,2 mL o la piastra da 96 pozzetti, per 10 secondi.
10. Agitare delicatamente nel vortex le provette per PCR da 0,2 mL o la piastra da 96 pozzetti, per 10 secondi.
11. Centrifugare per 10 secondi a bassa velocità (questo passaggio è particolarmente importante se la digestione è eseguita su uno strumento privo di coperchio riscaldato).
12. Incubare a 42 °C per 30 minuti.
13. Aggiungere 1,0 µL SURVEYOR Stop Solution (PN 708030) in ciascuna provetta o pozzetto e agitare delicatamente nel vortex (il volume di reazione totale di SURVEYOR Nuclease è di 16,0 µL).



**SUGGERIMENTO: I prodotti di digestione di SURVEYOR possono essere conservati a ≤ -20 °C per una settimana al massimo.**

14. Caricare la digestione dei campioni nel sistema DHPLC.

**Nota:** per le impostazioni del gradiente del sistema DHPLC consigliate per l'analisi delle digestioni SURVEYOR Nuclease, consultare il sito <http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings>.

## 13 Procedure di controllo

### 13.1 Controllo della qualità di CRC RAScan Combination Kit

Il kit contiene anche campioni di DNA plasmidico di controllo che consentono di eseguire controlli qualità in fasi specifiche della procedura di dosaggio. Nel caso del **Protocollo di Amplificazione** questi controlli consentono di verificare la corretta preparazione delle Master Mix nonché l'adeguato funzionamento dell'amplificazione. È consigliato anche l'uso di controlli NTC (si aggiunge acqua anziché templato di DNA) per la verifica di una possibile contaminazione con DNA dei componenti del kit.

In fase di digestione con SURVEYOR Nuclease, gli ampliconi di questi DNA plasmidici di controllo consentono di verificare in modo affidabile che le condizioni della reazione di taglio (preparazione della Master Mix di Digestione di SURVEYOR Nuclease e condizioni di incubazione) siano state soddisfacenti. In fase di analisi, gli cromato grammi DHPLC System degli ampliconi di controllo digeriti con SURVEYOR Nuclease indicano dove verranno eluiti i picchi dei prodotti di taglio corrispondenti a mutazioni in *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 e 4, anche a bassi livelli (vedere **Figure 4-10**). I picchi dei prodotti di taglio corrispondenti ad altre mutazioni in *KRAS* o *NRAS* Exons 2, 3 e 4 potrebbero essere eluiti in posizioni leggermente diverse.

Se gli ampliconi PCR non corrispondono ai risultati previsti dal **Controllo di Qualità dei Prodotti da PCR**, consultare l'**Appendice B - Guida alla Risoluzione dei Problemi** o rivolgersi al servizio di assistenza tecnica di Transgenomic prima di procedere ulteriormente con l'analisi dei campioni.

### 13.2 Uso di DNA plasmidici di controllo

I kit contengono nove DNA di controllo:

- KRAS* Control Wild-Type; PN 710131
- KRAS* Positive Control Exon 2; PN 710135
- KRAS* Positive Control Exon 3; PN 710136
- KRAS* Positive Control Exon 4A; PN 710137
- KRAS* Positive Control Exon 4B; PN 710138
- NRAS* Control Wild-Type; PN 710441
- NRAS* Positive Control Exon 2; PN 710442
- NRAS* Positive Control Exon 3; PN 710443
- NRAS* Positive Control Exon 4; PN 710444

Questi DNA di controllo sono plasmidi con inserti. I Positive Control contengono ciascuno due plasmidi: una miscela di *KRAS* o *NRAS* Control Wild-Type e un clone di mutazione che differisce dal Wild-Type per un'unica coppia di basi. I controlli sono contenuti in fiale separate, ciascuna ad una concentrazione di  $10^5$  copie/ $\mu$ L.

I primer *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 e 4 Forward e Reverse PCR necessari per l'amplificazione PCR sono forniti separatamente all'interno delle scatole dei kit. Per l'uso di questi controlli, attenersi alle istruzioni riportate nelle sezioni **Protocollo di Amplificazione**, Digestione con **SURVEYOR Nuclease** e **Analisi di *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 & 4 utilizzando SURVEYOR Nuclease**.

**RACCOMANDIAMO VIVAMENTE AGLI UTILIZZATORI INESPERTI DI ESEGUIRE ESPERIMENTI CON I SOLI CONTROLLI PRIMA DELL'ANALISI DEI CAMPIONI GENOMICI**

## 14 Interpretazione dei risultati

### 14.1 Analisi di *KRAS* e *NRAS* Exons 2, 3 e 4 utilizzando SURVEYOR Nuclease

A scopo di confronto/controllo, eseguire **SEMPRE** la digestione con SURVEYOR Nuclease su entrambi i controlli (controllo Wild-Type e Positive Control), su un controllo NTC e sui campioni di DNA, ed eseguire la procedura sulla stessa piastra del sistema DHPLC.

In fase di digestione con SURVEYOR Nuclease gli ampliconi di questi tre DNA plasmidici di controllo consentono di verificare in modo affidabile che le condizioni della reazione di taglio (preparazione della miscela di SURVEYOR Nuclease e condizioni di incubazione) siano state soddisfacenti. In fase di analisi, i tracciati del sistema DHPLC di questi ampliconi di controllo digeriti con SURVEYOR Nuclease indicano dove verranno eluiti i frammenti di DNA derivanti dal taglio in corrispondenza di queste specifiche mutazioni, anche a bassi livelli (ved. **Figure 4-10**).

Se gli ampliconi di PCR o i frammenti di taglio della SURVEYOR Nuclease derivanti dai DNA plasmidici di controllo non corrispondono ai risultati previsti, consultare l'Appendice B -Guida alla Risoluzione dei Problemi o rivolgersi al servizio di assistenza tecnica di Transgenomic prima di procedere ulteriormente con l'analisi dei campioni.

Gli esempi forniti di seguito hanno solo scopo illustrativo e **NON DEVONO** essere usati per determinare l'identità di qualsivoglia mutazione. La conferma dell'identità di una mutazione è necessaria al fine di determinare in modo inequivocabile la presenza di un'alterazione in una base specifica negli Exons 2, 3 o 4 dei geni *KRAS* e *NRAS*.

**SURVEYOR Nuclease taglia tutti i mismatch derivanti dalla formazione di eteroduplici tra i DNA Wild-Type e mutanti, non solo le mutazioni negli Exons 2, 3 o 4.** SURVEYOR Nuclease conferma la presenza di un mismatch. L'identità specifica dell'alterazione di base della mutazione è richiesta per la determinazione dello stato *KRAS*-e *NRAS*-attivante e deve essere confermata con un altro metodo, ad esempio il sequenziamento.

## 14.2 Revisione dei dati dei risultati SURVEYOR Scan

Analizzare i cromatogrammi e confrontare quelli dei Wild-Type e Positive Control con quello del campione. Stabilire se il cromatogramma del campione è simile o diverso dal pattern Wild-Type. Se è diverso, il campione deve essere considerato "SURVEYOR Scan Positive" e sottoposto a conferma mediante sequenziamento del DNA. Ved. **Figure 4-10** per degli esempi e l'**Appendice B – Guida alla risoluzione dei problemi, Problemi 7 e 8** per esempi di tali campioni.

Qualunque campione con un pattern SURVEYOR Nuclease diverso dal Wild-Type deve essere sottoposto alla conferma mediante sequenziamento anche se non è identico al Positive Control. Ved. **Appendice B – Guida alla risoluzione dei problemi, Problema 7** per un esempio di tale campione.

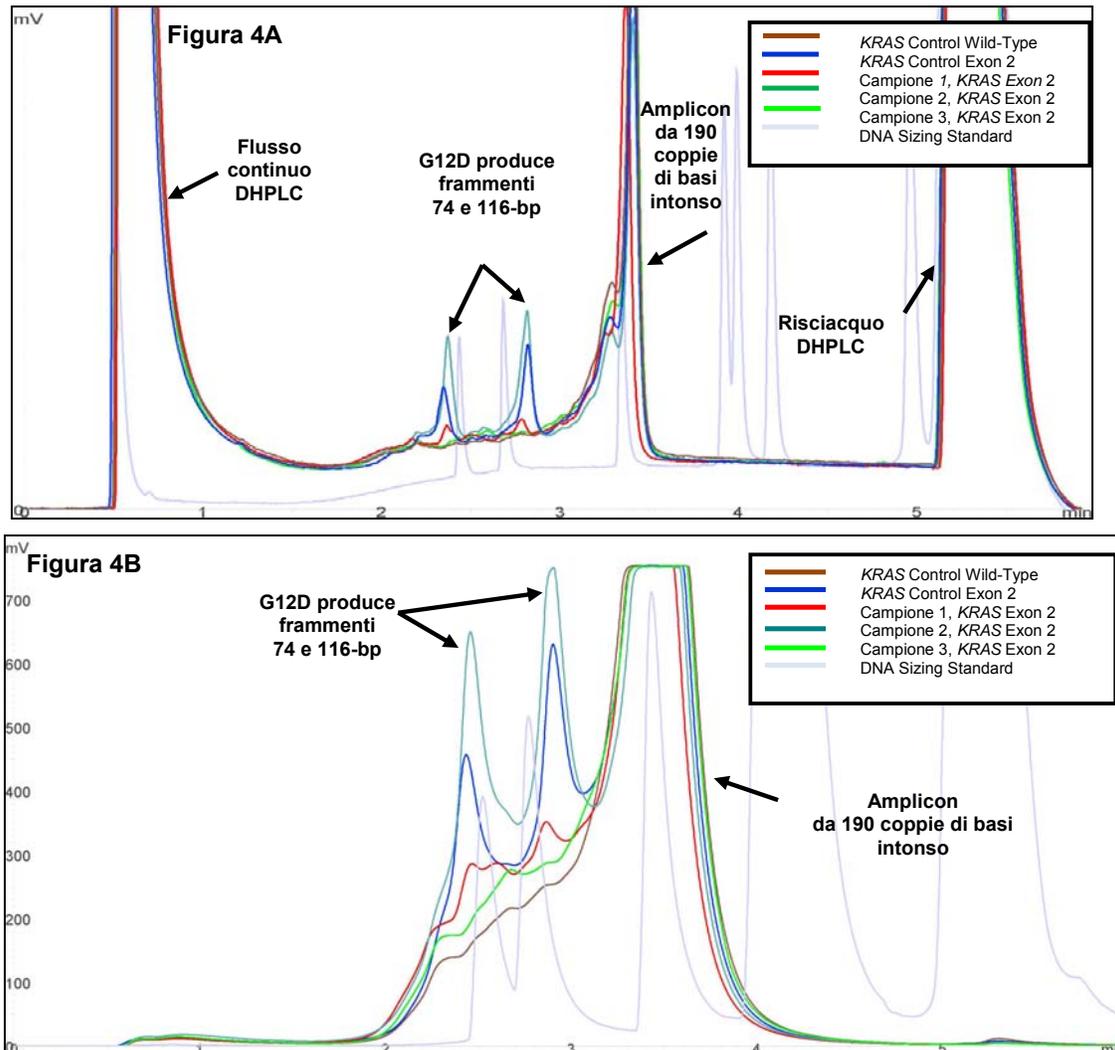
Se richiesto, effettuare lo zoom sulla regione di interesse e sovrapporre il cromatogramma del campione con il Wild-Type Control per tale amplicone.

Osservare eventuali differenze fra il Wild-Type Control campione analizzato.

**Importante!** Dopo un'attenta revisione di ciascun campione, il revisore dei dati deve esaminare se i campioni adiacenti nella piastra di analisi hanno risultati identici positivi per il SURVEYOR Scan . Se sono presenti risultati positivi identici, questi possono derivare da contaminazione incrociata del campione o del controllo. L'analisi deve essere ripetuta.

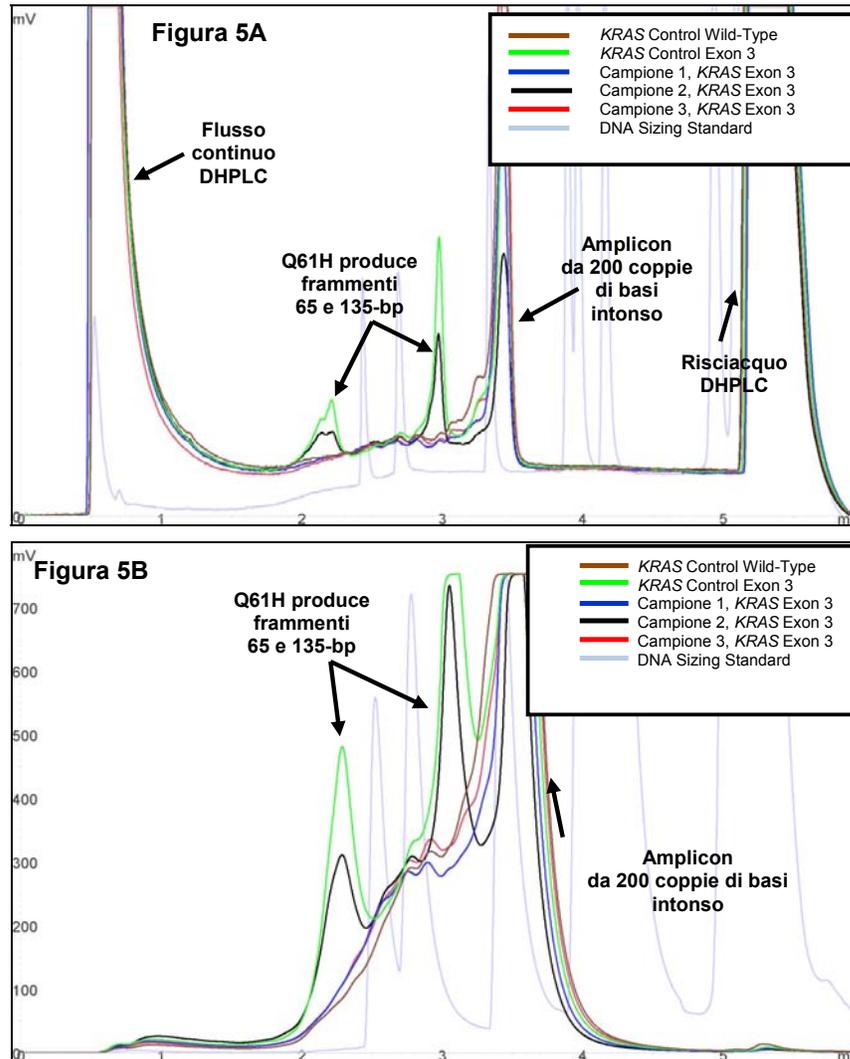
### 14.3 Esempi dei risultati

Esempi dei risultati ottenuti utilizzando CRC RAScan Combination Kit con un sistema DHPLC, sono illustrati nelle **Figure 4-10** seguenti. In questi esempi, utilizzando WAVE® 4500HT-HS System con rilevatori UV e fluorescenti, il processo illustrato nella sezione **Istruzioni dettagliate** è stato seguito alla lettera. Per indicazioni sulle impostazioni consigliate del gradiente del sistema DHPLC per l'analisi delle digestioni SURVEYOR Nuclease, consultare il sito <http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsettings>.

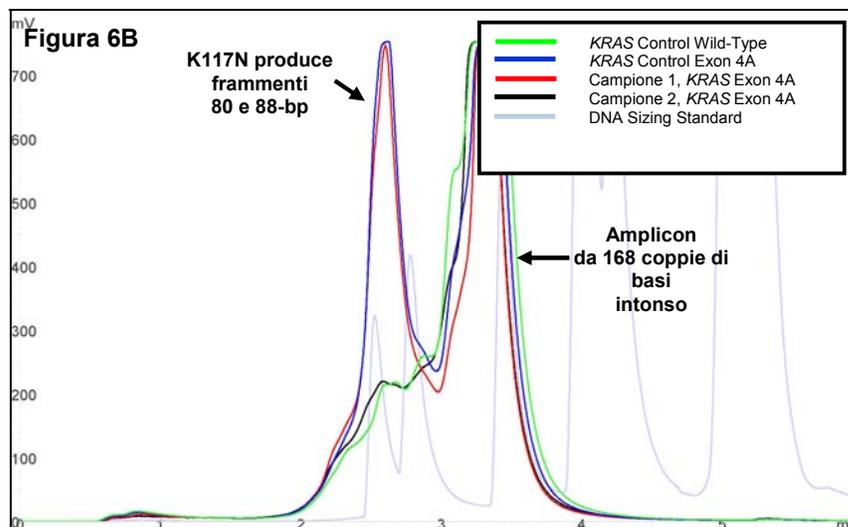
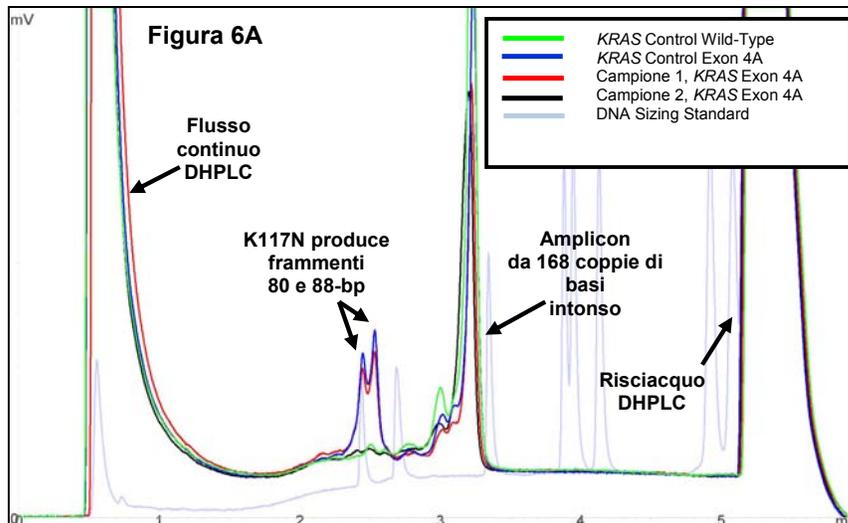


**Figure 4A e 4B: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 4A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 4B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di KRAS Positive Control Exon 2 e KRAS Control Wild-Type e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE.** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con il Wild-Type Control (linea marrone). KRAS Positive Control Exon 2 (linea blu) è una miscela di plasmidi Wild-Type e G12D mutanti che produce picchi di digestione da 74 e 116 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione relativi ai campioni 1-3 con l'elettroferogramma non digerito Wild-Type, risulta evidente che i campioni 1 e 2 (linee rossa e turchese) presentano delle probabili mutazioni e devono essere sottoposti a sequenziamento per confermare la presenza o assenza di una mutazione a livello del relativo codone. Il campione 3 (linea verde) presenta cromatogrammi simili a quelli osservati per il Wild-Type Control e non è

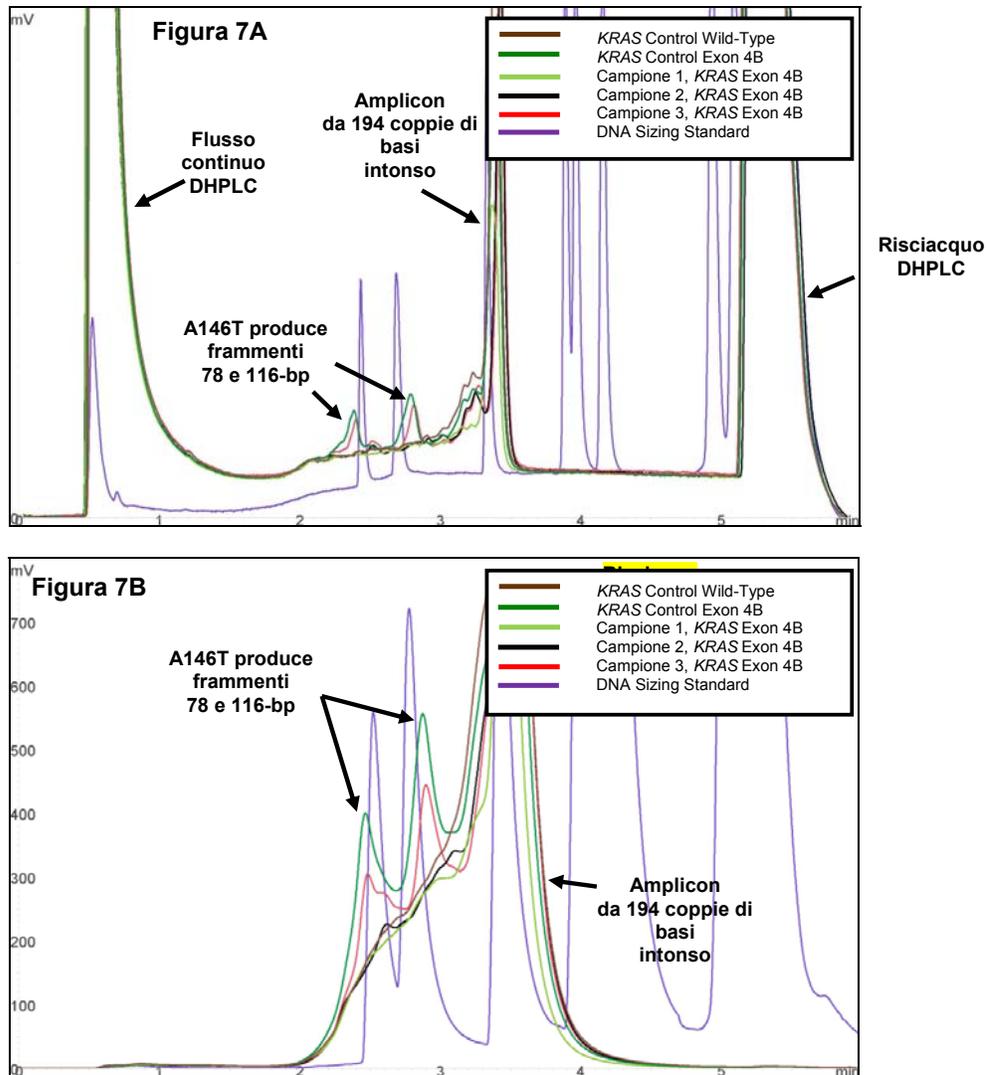
necessario sottoporlo all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.



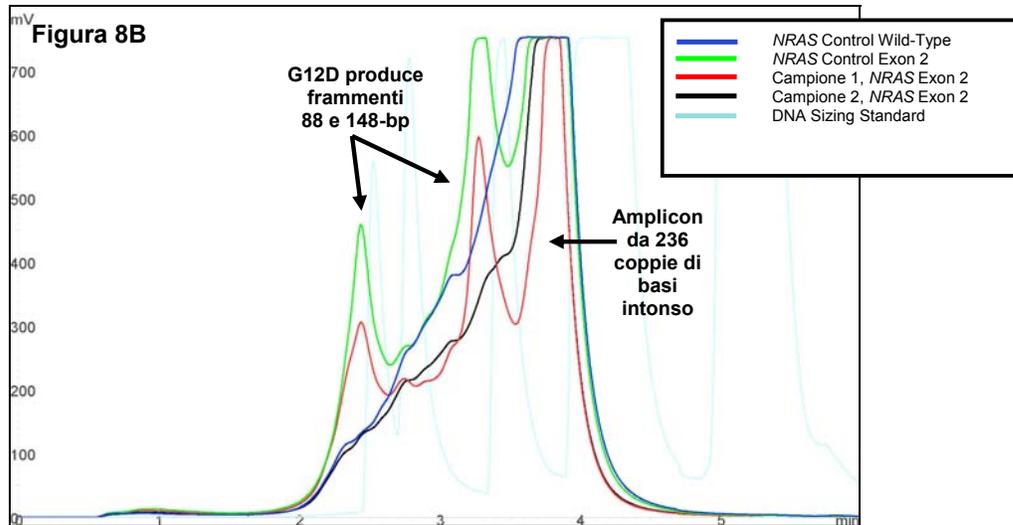
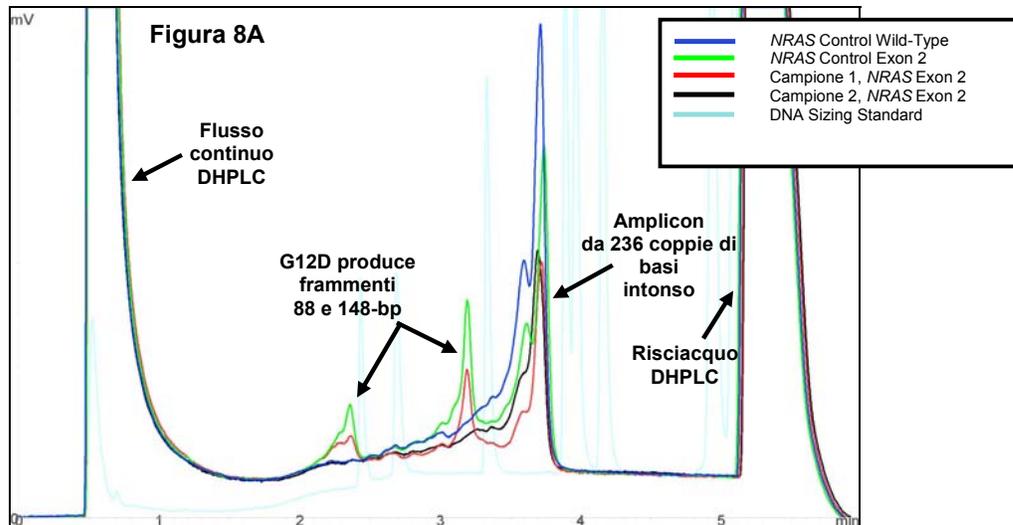
**Figure 5A e 5B: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 5A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 5B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di KRAS Positive Control Exon 3 e KRAS Control Wild-Type e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE.** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con il Wild-Type Control (linea marrone). KRAS Positive Control Exon 3 (linea verde) è una miscela di plasmidi Wild-Type e G12D mutanti che produce picchi di digestione da 65 e 135 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione relativi ai campioni 1-3 con l'elettroferogramma non digerito Wild-Type, risulta evidente che il campione 2 (linea nera) presenta una probabile mutazione e deve essere sottoposto a sequenziamento per confermare la presenza o assenza di una mutazione a livello del relativo codone. I campioni 1 e 3 (linea blu e rossa) presentano cromatogrammi simili a quelli osservati per il Wild-Type Control e non è necessario sottoporli all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.



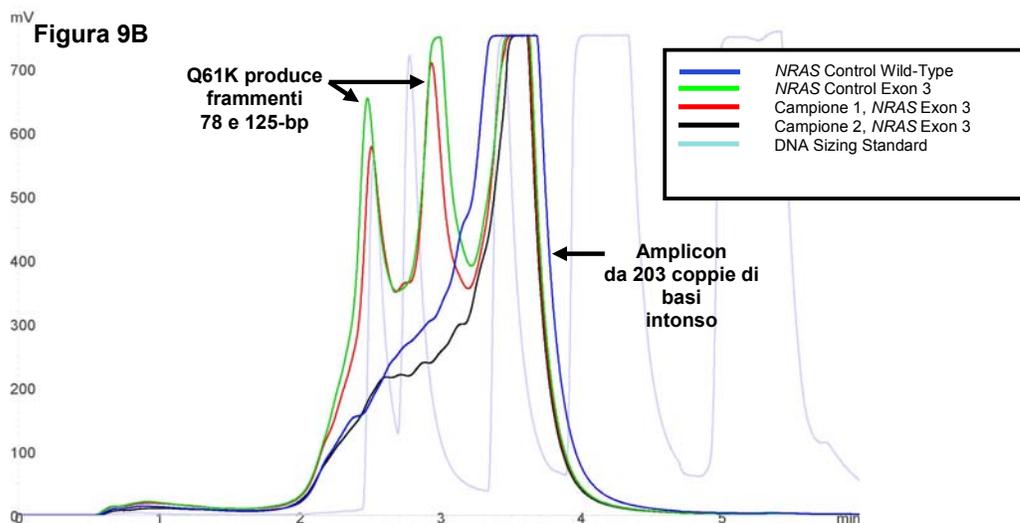
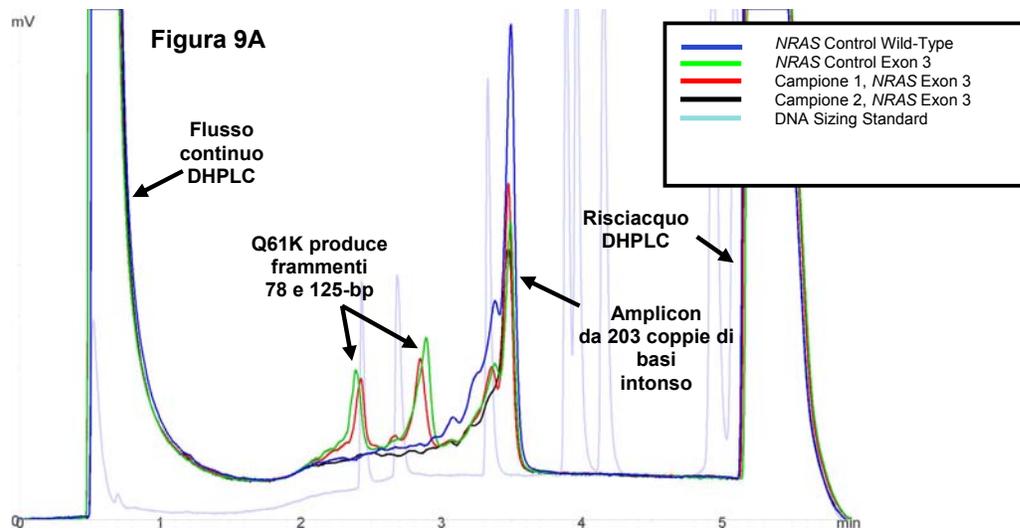
**Figure 6A e 6B: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 6A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 6B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di KRAS Positive Control Exon 4A e KRAS Control Wild-Type e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE .** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con il Wild-Type Control (linea verde). *KRAS* Positive Control Exon 4A (linea blu) è una miscela di plasmidi Wild-Type e K117N mutanti che produce picchi di digestione da 80 e 88 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione relativi ai campioni 1 e 2 con l'elettroferogramma non digerito Wild-Type, risulta evidente che il campione 1 (linea rossa) presenta una probabile mutazione e deve essere sottoposto a sequenziamento per confermare la presenza o assenza di una mutazione a livello del relativo codone. Il campione 2 (linea nera) presenta un cromatogramma simile a quello osservato per il Wild-Type Control e non è necessario sottoporlo all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.



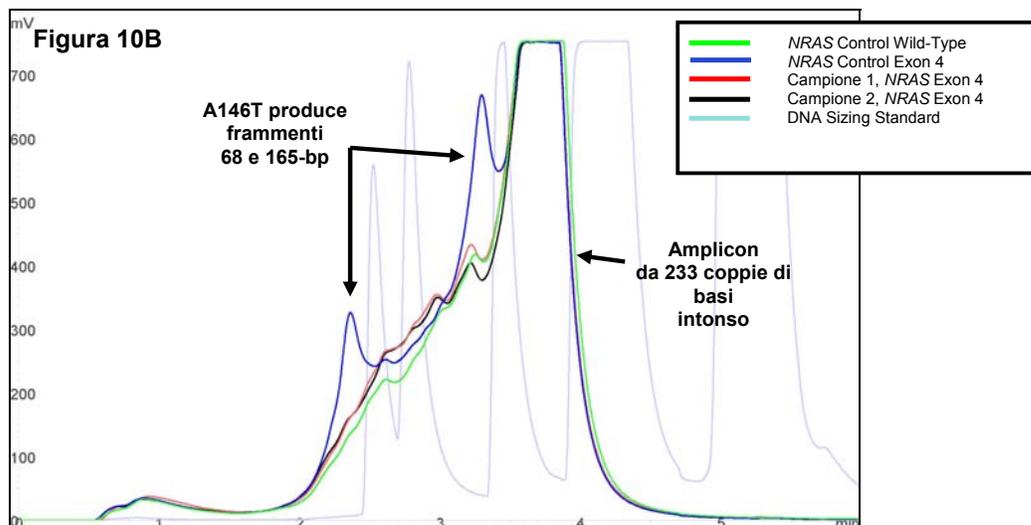
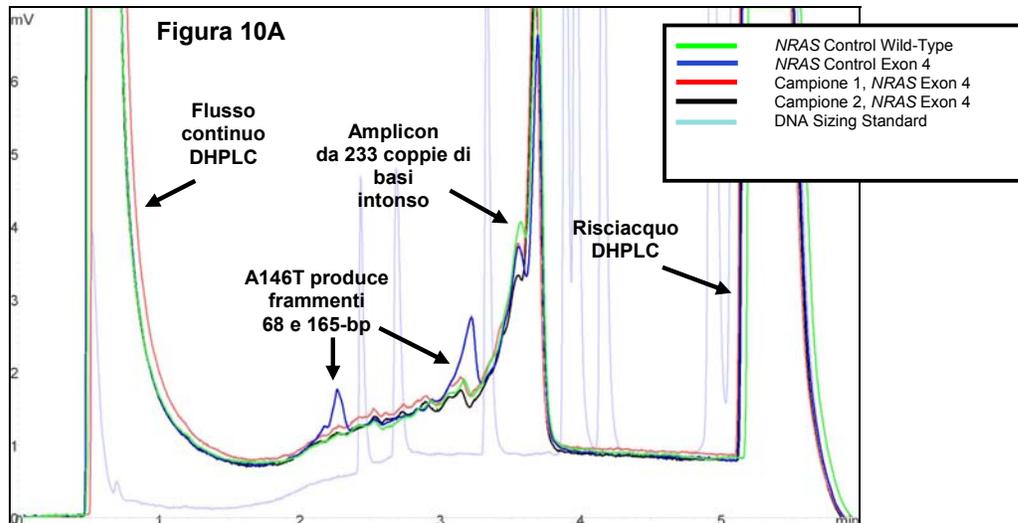
**Figure 7A e 7B: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 7A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 7B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di KRAS Positive Control Exon 4B e KRAS Control Wild-Type e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE .** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con il Wild-Type Control (linea marrone). KRAS Positive Control Exon 4B (linea verde scuro) è una miscela di plasmidi Wild-Type e A146T mutanti che produce picchi di digestione da 78 e 116 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione relativi ai campioni 1-3 con l'elettroferogramma non digerito Wild-Type, risulta evidente che il campione 3 (linea rossa) presenta una probabile mutazione e deve essere sottoposto a sequenziamento per confermare la presenza o assenza di una mutazione a livello del relativo codone. I campioni 2 e 3 (linea nera e verde chiaro) presentano cromatogrammi simili a quelli osservati per il Wild-Type Control e non è necessario sottoporli all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.



**Figure 8A e 8B: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 8A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 8B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di NRAS Positive Control Exon 3 e Wild-Type Control e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE .** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con *NRAS* Control Wild-Type (linea blu). *NRAS* Positive Control Exon 2 (linea verde) è una miscela di plasmidi Wild-Type e G12D mutanti che produce picchi di digestione da 88 e 148 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione relativi ai campioni 1 e 2 con l'elettroferogramma digerito Wild-Type, risulta evidente che il campione 1 (linea rossa) presenta una probabile mutazione e deve essere sottoposto a sequenziamento per confermare la presenza o assenza di una mutazione a livello del relativo codone. Il campione 2 (linea nera) presenta un cromatogramma simile a quello osservato per il *NRAS* Control Wild-Type e non è necessario sottoporlo all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.



**Figure 9A e 9B: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 9A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 9B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di NRAS Positive Control Exon 3 e Wild-Type Control e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE.** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con NRAS Control Wild-Type (linea verde). NRAS Positive Control Exon 3 (linea blu) è una miscela di plasmidi Wild-Type e Q61K mutanti che produce picchi di digestione da 78 e 125 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione relativi ai campioni 1 e 2 con l'elettroferogramma digerito Wild-Type, risulta evidente che il campione 1 (linea rossa) presenta una probabile mutazione e deve essere sottoposto a sequenziamento per confermare la presenza o assenza di una mutazione a livello del relativo codone. Il campione 2 (linea nera) presenta un cromatogramma simile a quello osservato per il NRAS Control Wild-Type e non è necessario sottoporlo all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.



**Figure 10A e 10: Analisi WAVE DHPLC con UV (Figura 10A) e rilevamento della fluorescenza (Figura 10B) delle digestioni SURVEYOR Nuclease di NRAS Positive Control Exon 4 e Wild-Type Control e CRC DNA isolato dalle sezioni FFPE.** Quando si controllano a vista i cromatogrammi, i campioni digeriti devono essere confrontati con NRAS Control Wild-Type NRAS Control Wild-Type (linea verde). NRAS Positive Control Exon 4 (linea blu) è una miscela di plasmidi Wild-Type e A146T mutanti che produce picchi di digestione da 68 e 165 coppie di basi; questo controllo indica che la fase di digestione SURVEYOR Nuclease è attiva e mostra la regione del cromatogramma da controllare visivamente per capire se è necessario sottoporre un campione all'analisi mediante sequenziamento del DNA. Confrontando i pattern di digestione dei campioni 1 e 2 con l'elettroferogramma digerito Wild-Type, risulta evidente che i campioni 1 e 2 (linee rossa e nera) presentano cromatogrammi simili a quello osservato per NRAS Control Wild-Type e non è necessario sottoporli ad analisi mediante sequenziamento del DNA. Va osservato che per risultati positivi SURVEYOR Scan, il risultato del sequenziamento è il risultato definitivo, in quanto potrebbero essere registrate altre mutazioni non rilevanti che possono comportare le stesse dimensioni dei frammenti.

## 15 Caratteristiche prestazionali

### 15.1 Livello di rilevamento delle mutazioni mediante i kit SURVEYOR Scan

La convalida dei kit SURVEYOR Scan per piattaforme DHPLC che utilizzano coni plasmidici di tutte le mutazioni indicate, ha evidenziato che i picchi SURVEYOR Nuclease possono essere rilevati in una miscela di mutante al 2-5% su uno sfondo Wild-Type.

L'uso del sequenziamento automatizzato dei filamenti forward e reverse spesso non è in grado di rilevare la mutazione in miscele con DNA Wild-Type se inferiore al 10%. Unitamente ai risultati di SURVEYOR Nuclease è possibile interpretare con maggiore affidabilità gli cromatogramma di sequenziamento di mutazioni fino al 5-10%.

**Se l'analisi di un campione mostra un risultato positivo per SURVEYOR Scan ma non sono presenti mutazioni KRAS o NRAS individuabili mediante sequenziamento del DNA, si consiglia di registrare il risultato come "Nessuna variante individuata". Per maggiori informazioni si veda la sezione *Considerazioni sul Flusso di Lavoro*.**

### 15.2 Conferma Mediante Sequenziamento

Procedere alla conferma mediante sequenziamento per tutti i risultati positivi di SURVEYOR Scan per stabilire l'identità per sequenziamento delle mutazioni KRAS o NRAS Exons 2, 3 o 4. La **Figura 11** è un esempio dell'importanza della conferma mediante sequenziamento per determinare l'esatta mutazione.

Non procedere alla conferma mediante sequenziamento se SURVEYOR Scan ha prodotto un risultato negativo. Il campione può essere riferito come Wild-Type o "nessuna variante individuata".

Gli Universal Sequencing Primer inclusi nel kit devono essere utilizzati per la conferma mediante sequenziamento. Il primer forward è PN 710153F (Universal Sequencing Primer 1) e il primer reverse è PN 710153R (Universal Sequencing Primer 2).



**Figura 11 Analisi mediante sequenziamento dei campioni con lo stesso pattern di digestione KRAS Exon 2 SURVEYOR Nuclease.** I campioni 1 e 2 summenzionati hanno registrato lo stesso pattern dei picchi DHPLC in seguito alla digestione SURVEYOR Nuclease e sono stati sottoposti ad ulteriore analisi mediante sequenziamento del DNA. Dal sequenziamento risultano presenti 2 diverse mutazioni: G13C e G13D. Questi campioni illustrano (a) la capacità di SURVEYOR Nuclease di individuare possibili mutazioni e (b) la sua incapacità a determinare l'esatta ubicazione o l'alterazione di base specifica di una mutazione presente in un campione di test.

**Nota:** è importante verificare l'assenza della sequenza del "timbro" in ogni elettroferogramma di sequenziamento per confermare che la mutazione non deriva dalla contaminazione del campione con un controllo del kit.

**Nota:** se il campione del test è Wild-Type a livello del(i) rispettivo(i) codone(i) interessato(i) ed è presente la sequenza "timbrato", il campione del test è "contaminato" e deve essere rianalizzato. La presenza del "timbro" dei kit; questa contaminazione potrebbe nascondere una mutazione di basso livello presente nel campione del test Wild-Type Control dei kit; questa contaminazione potrebbe nascondere una mutazione di basso livello presente nel campione del test. Ved. **A.2 Timbri DNA dei controlli** per informazioni dettagliate sulle sequenze del timbro dei controlli.

### 15.3 Limitazioni della procedura di dosaggio

È possibile che la presenza di sostanze contaminanti derivate dall'estrazione di campioni inclusi in paraffina e fissati in formalina interferisca con l'amplificazione PCR e con le procedure di digestione tramite SURVEYOR Nuclease. Il rispetto delle procedure di qualità illustrate nella sezione **Controllo di Qualità dei Prodotti da PCR** farà sì che il DNA estratto sia idoneo all'uso con il presente kit.

Il presente kit è stato convalidato per l'analisi con campioni biotici di tumore coloretale inclusi in paraffina e fissati in formalina. Non è invece stato convalidato per l'uso diagnostico né con altri tipi di tumore né con campioni biotici freschi o congelati.

Per la risoluzione di problemi relativi a risultati non standard e per maggiori dettagli su fattori che possono compromettere questo dosaggio, vedere la sezione **Appendice B - Guida alla Risoluzione dei Problemi** di seguito.

Evitare il carryover e la contaminazione crociata. L'estrema sensibilità di questo metodo di dosaggio richiede l'adozione delle seguenti precauzioni:

- Accertarsi che tutti i campioni vengano gestiti in modo tale da evitare la cross-contaminazione tra i campioni
- Operare in una postazione di lavoro per PCR o in altre postazioni idonee dove l'area di lavoro possa essere esposta ai raggi UV prima di preparare le reazioni di amplificazione PCR.
- Usare una postazione di lavoro per PCR separata o una stanza diversa per aprire i campioni dopo l'amplificazione per PCR per il controllo qualità mediante elettroforesi in gel.
- Eseguire la preparazione della digestione SURVEYOR Nuclease in una stanza separata o in una postazione di lavoro per PCR differente rispetto a quella utilizzata per la preparazione della PCR iniziale.
- Accertarsi che i controlli plasmidici del kit vengano manipolati separatamente dai campioni utilizzati per il test in tutte le fasi del dosaggio.
  - Assicurarsi che tutte le soluzioni, i controlli NTC e i pozzetti dei campioni di DNA siano coperti prima di aprire le provette contenenti il DNA plasmidico di controllo.
  - **MANIPOLARE I CONTROLLI PER ULTIMI.** Aggiungere il DNA plasmidico di controllo alle provette appropriate solo DOPO AVERE COPERTO TUTTI i NTC e i pozzetti dei campioni.
  - Dopo avere coperto tutte le provette del DNA di controllo, pulire TUTTE le provette e TUTTI i coperchi con un prodotto in grado di distruggere il DNA (ad esempio, candeggina al 10%) prima del trasferimento in un'altra area.
- Accertarsi che l'operazione di pipettaggio del campione nelle piastre da 96 pozzetti non provochi la contaminazione di pozzetti contigui dovuti a schizzi formati durante la miscelazione o alla mancata sostituzione dei puntali.

## Appendice A

### A.1 Piano di layout della piastra per kit SURVEYOR Scan

Il piano di layout della piastra indicato nel seguito si riferisce all'esecuzione dell'analisi SURVEYOR Scan di tutti i sette *KRAS* e *NRAS* Exons contemporaneamente su 10 campioni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A: <i>KRAS</i> EX 2	<i>KRAS</i> Ex 2 WT	<i>KRAS</i> Ex 2 Mut	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
B: <i>KRAS</i> EX 3	<i>KRAS</i> Ex 3 WT	<i>KRAS</i> Ex 3 Mut										
C: <i>KRAS</i> EX 4A	<i>KRAS</i> Ex 4A WT	<i>KRAS</i> Ex 4A Mut										
D: <i>KRAS</i> EX 4B	<i>KRAS</i> Ex 4B WT	<i>KRAS</i> Ex 4B Mut										
E: <i>NRAS</i> EX 2	<i>NRAS</i> Ex 2 WT	<i>NRAS</i> Ex 2 Mut										
F: <i>NRAS</i> EX 3	<i>NRAS</i> Ex 3 WT	<i>NRAS</i> Ex 3 Mut										
G: <i>NRAS</i> EX 4	<i>NRAS</i> Ex 4 WT	<i>NRAS</i> Ex 4 Mut	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
H:	Vuoto	Vuoto	Vuoto	Vuoto	Vuoto	NTC <i>KRAS</i> Ex 2	NTC <i>KRAS</i> Ex 3	NTC <i>KRAS</i> Ex 4A	NTC <i>KRAS</i> Ex 4B	NTC <i>NRAS</i> Ex 2	NTC <i>NRAS</i> Ex 3	NTC <i>NRAS</i> Ex 4

**Chiave:** Ex = Exon; WT = Wild-Type; Mut = Mutazione; NTC = Controllo privo di template.

### A.2 Timbri DNA dei controlli

Le sequenze con un "Timbro" sono indicate nel seguito.

**Chiave:** le regioni di mutazione più comuni sono evidenziate in **porpora**. La sequenza in MAIUSCOLO si riferisce alle basi di codifica; la sequenza in minuscolo alle basi non codificate.

I controlli hanno un "timbro" genetico evidenziato in **giallo**; queste variazioni dalla sequenza *KRAS* o *NRAS* Wild-Type in una regione in cui non sono previste mutazioni, possono essere usate per risolvere il problema della contaminazione dei campioni dai Positive Control. Ved. **Appendice B - Guida alla risoluzione dei problemi, Problema 8**, per l'esempio di un tracciato SURVEYOR Scan di tale contaminazione.

#### "Timbro" *KRAS* Exon 2

Dimensione Amplicone: 190 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *KRAS* Exon 2, TAT viene modificato in ATA. Anche i codoni 12 e 13 sono evidenziati come segue.

GCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAAATAGAT

#### "Timbro" *KRAS* Exon 3

Dimensione Amplicone: 200 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *KRAS* Exon 3, ACC viene modificato in TGG. Anche i codoni 59 e 61 sono evidenziati come segue.

GAAATGGTGTCTCTTGATATTTCTCGACACAGCAGGTCAGAG

#### "Timbro" *KRAS* Exon 4A

Dimensione Amplicone: 168 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *KRAS* Exon 4A, AGA viene modificato in TCT. Anche il codone 117 è evidenziato nel seguito.

AATAAATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTTCTCAC

**"Timbro" KRAS Exon 4B**

Dimensione Amplicone: 194 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *KRAS* Exon 4B, *agt* viene modificato in *tca*. Anche il codone 146 è evidenziato nel seguito.

TCAGCAAGACAAGACAGgtatcaaac

**"Timbro" NRAS Exon 2**

**Dimensione Amplicone:** 236 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *NRAS* Exon 2, *aca* viene modificato in *tgt*. Anche i codoni 12 e 13 sono evidenziati come segue.

cca<sup>tgt</sup>ggttccttgcgtggtgtgaaATGACTGAGTACAACTGGTGGTGGTTGGAGCA<sup>GGTGGT</sup>GTT

**"Timbro" NRAS Exon 3**

**Dimensione Amplicone:** 203 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *NRAS* Exon 3, *GAC* viene modificato in *CTG*. Anche i codoni 59 e 61 sono evidenziati come segue.

ACA<sup>GCT</sup>GGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGA<sup>CTG</sup>CAA

**"Timbro" NRAS Exon 4**

**Dimensione Amplicone:** 233 coppie di basi Per la creazione del timbro genetico del plasmide di controllo *NRAS* Exon 4, *CAA* viene modificato in *GTT*. Anche i codoni 117 e 146 sono evidenziati come segue.

AACAAGTGTGATTTGCCAACAAGGACAGTTGATACAAAAG<sup>GTT</sup>GCCCACGAACTGGCCAAGAGTTACGGG  
ATTCCATTCATTGAAACCTCAG<sup>GCC</sup>AAG

**A.3 Denaturazione di HPLC (DHPLC), Requisiti di sistema****A.3.1 DHPLC Requisiti per applicazioni SURVEYOR SCAN**

Le seguenti specifiche sono i requisiti minimi per i requisiti del sistema DHPLC relativi all'esecuzione dei dosaggi del kit SURVEYOR Scan *KRAS* & *NRAS*.

**Sistema di erogazione del solvente a gradiente ad alta efficienza**

- Capacità del gradiente binario; alta pressione o bassa pressione
- Controllo del flow rate, range minimo: 0,7 – 1,6 mL/min
- Precisione del flow rate: ± 2% (H<sub>2</sub>O a 20 °C)
- Degasatore del solvente

**Autocampionatore**

- Controllo della temperatura per raffreddare piastre, regolabile: da 4 a 14 °C
- Volume di iniezione 5 – 50 µL

**Cartuccia di separazione**

- Ideata per la separazione dei formati di frammenti di dsDNA, formati di frammenti da 50 a 250 coppie di basi

**Forno di alta precisione con controllo della temperatura**

- Range temperatura: da 40 a 70 °C
- Precisione temperatura: ± 0,2 °C
- Riproducibilità temperatura: ± 0,2 °C
- Linearità su tutto il range di temperatura: ± 2,0 °C

**Alternativa rilevamento 1**

- **Rilevatore UV/VIS**
  - Range lunghezza d'onda: 190 – 700 nm
  - Sorgente UV: Lampada al deuterio

**Alternativa rilevamento 2**

- **Rilevatore fluorescenza**
  - Range lunghezza d'onda: eccitazione: 200 – 850 nm; emissione: 250 – 900 nm
  - Sorgente di fluorescenza: Lampada Xenon 150W
- **Pompa per bagni coloranti fluorescenti**
  - Flow rate fisso a 0,1 mL/min – 20%/+50%
  - Flusso a basse pulsazioni

**A.3.2 Funzionamento del sistema**

Per la configurazione e il funzionamento del sistema DHPLC, consultare e seguire le raccomandazioni del produttore per l'analisi dei frammenti di dsDNA che rientrano nel range di dimensioni da 50 a 250 coppie di basi, mirando alla discriminazione dei formati da 10 coppie di basi o migliore. Questo è il range delle dimensioni per i frammenti in seguito alla digestione SURVEYOR Nuclease utilizzando questo kit.

Per indicazioni sulle impostazioni consigliate del gradiente del sistema DHPLC per l'analisi delle digestioni SURVEYOR Nuclease, consultare il sito <http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsettings>.

**A.3.3 Manutenzione delle cartucce DHPLC**

Per la manutenzione delle cartucce DHPLC, seguire le raccomandazioni del produttore.

**Nota:** l'analisi delle reazioni SURVEYOR Nuclease richiederà protocolli di pulizia più frequenti e rigorosi rispetto a quelli dell'analisi dei campioni PCR standard. Consultare le linee guida del sistema DHPLC per maggiori informazioni.

## A.4 Setup del laboratorio per dosaggi PCR

Per ottenere risultati PCR affidabili e senza contaminazioni, seguire buone prassi di laboratorio nel predisporre il layout del laboratorio PCR.

Nel programmare la disposizione del laboratorio, tenere conto della necessità di una separazione spaziale tra il setup dell'amplificazione PCR e le attività post-amplificazione. È importante separare (i) isolamento DNA: (ii) amplificazione PCR e (iii) attività Post-PCR quali l'apertura di provette contenenti campioni amplificati nella preparazione dei running gel e la configurazione di altri dosaggi quali le digestioni SURVEYOR Nuclease e il sequenziamento del DNA.

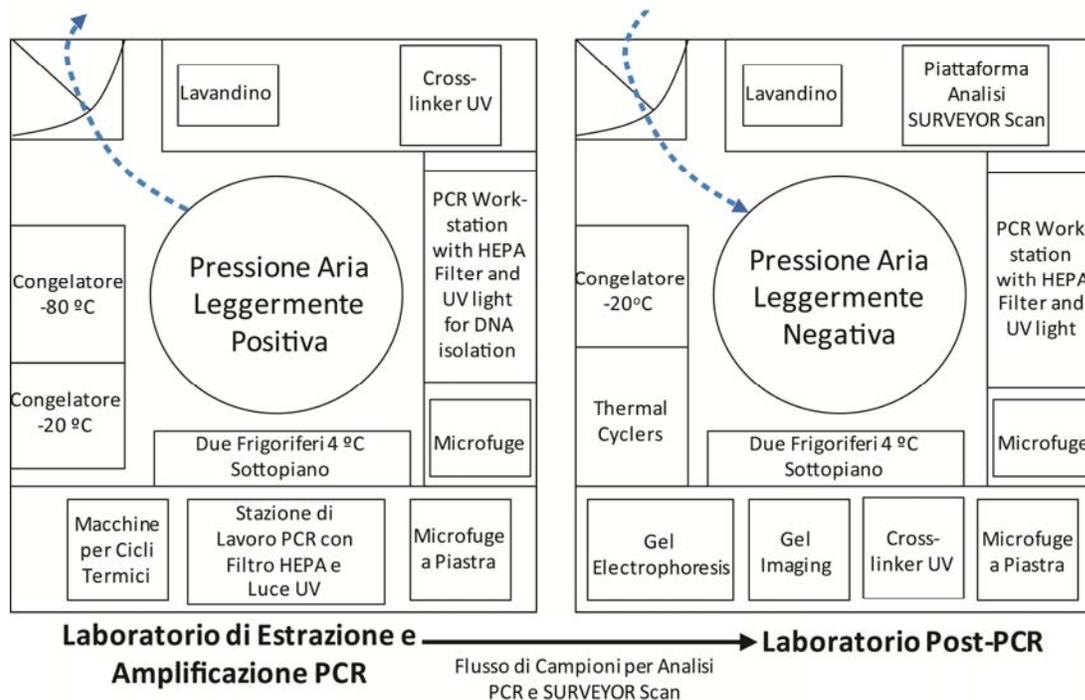
È altrettanto importante disporre di forniture e apparecchiature di laboratorio specifiche per ogni zona e da utilizzare unicamente in tale zona. La pulizia delle superfici con candeggina al 10% (v/v), preparata settimanalmente, consentirà l'eliminazione dei frammenti di DNA  $\leq 500$  coppie di basi, quali gli stampi per PCR. Inoltre, può essere utile trattare prodotti in materiale plastico e soluzioni con un'esposizione di 7–10 minuti ai raggi UV a onde corte utilizzando un crosslinker UV.

**Nota:** gli enzimi e il DNA da amplificare **non devono** essere sottoposti ai raggi UV.

Indossare indumenti protettivi adeguati, cambiare spesso i guanti e lavarsi le mani guantate con una soluzione di candeggina al 10% (v/v) prima di recarsi nella postazione di lavoro, contribuirà notevolmente a ridurre la contaminazione.

Come minimo, deve essere allestito un setup simile alla disposizione a due stanze illustrata nello schema seguente progettato espressamente per PCR e analisi mediante SURVEYOR Nuclease.

### Organizzazione di laboratorio PCR consigliata



## A.5 Bibliografia di riferimento

1. Amgen News Release (2013) New analyses identify predictive biomarkers for Vectibix® (panitumumab) in patients with metastatic colorectal cancer. [http://www.ext.amgen.com/media/media\\_pr\\_detail.jsp?-year=2013&releaseID=1820728](http://www.ext.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?-year=2013&releaseID=1820728)
  2. Peeters M *et al* (2013) Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 19 1902-12.
  3. De Roock W *et al* (2010) Association of *KRAS* p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304 1812-20.
  4. Peeters M *et al* (2013) Mutant *KRAS* codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol.* 31 759-65.
  5. Andre T *et al* (2013) Panitumumab combined with irinotecan for patients with *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Ann Oncol.* 24 412-9.
  6. Loupakis F *et al* (2009) *KRAS* codon 61, 146 and *BRAF* mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101 715-21.
  7. De Roock W *et al* (2010) Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 11 753-62.
  8. Qiu P *et al* (2004) Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques* 36 702-707
  9. Kuang Y *et al* (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 15 2630-6
  10. Mitani N *et al* (2007) Surveyor nuclease-based detection of p53 gene mutations in haematological malignancy. *Ann. Clin. Biochem.* 44 557-9
  11. Engelman JA *et al* (2006) Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J. Clin. Invest.* 116 2695-2706
- Vedere anche <http://world.transgenomic.com/files/literature/482146.pdf> per i riferimenti circa SURVEYOR Nuclease e le sue applicazioni.

## Appendice B

### Guida alla risoluzione dei problemi

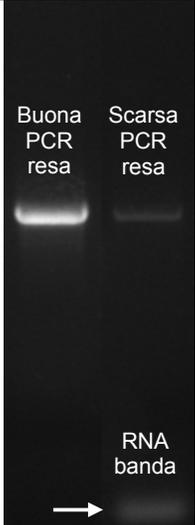
Per un uso efficace di SURVEYOR Scan Kits for DHPLC è necessario completare correttamente diverse fasi. Una delle più critiche è l'amplificazione PCR che deve dare come risultato la produzione di una quantità di molecole di DNA specifiche e di dimensioni uniformi tali da essere rilevate in seguito a ibridizzazione e clivaggio. E ciò dipende a sua volta dalla qualità del campione iniziale. Si sconsiglia di eseguire il dosaggio con un DNA che non soddisfa i criteri di qualità e quantità.

**Nota:** raccomandiamo agli utilizzatori non esperti di SURVEYOR Nuclease, di eseguire gli esperimenti illustrati nella sezione **Usa di DNA Plasmidici di Controllo** dopo aver letto e compreso quanto riportato nella sezione **Istruzioni Dettagliate**. Attendere i risultati dei DNA plasmidici di controllo prima di rivolgersi all'assistenza tecnica Transgenomic .

La presente Guida alla risoluzione dei problemi tratta una serie di problematiche che possono insorgere durante l'uso dei kit SURVEYOR Scan per DHPLC e fornisce una serie di suggerimenti su come risolverle. Gli esempi illustrati riguardano *KRAS* e *NRAS* Exons.

Per maggiori dettagli sull'utilizzo e la manutenzione dello strumento, consultare il manuale di istruzioni del sistema DHPLC. Il manuale comprende procedure specifiche per il controllo e la manutenzione delle prestazioni della colonna e fornisce informazioni dettagliate per la risoluzione dei problemi.

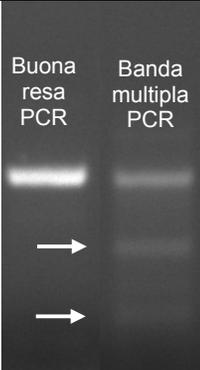
### Problema 1 – PCR bassa o nessun prodotto di PCR quando analizzato su gel di agarosio

BASSA RESA PCR	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
	Scarsa qualità del DNA stampo	Ripetere la purificazione del DNA; verificare il metodo di purificazione utilizzato. Se il DNA estratto da FFPE risulta troppo frammentato, potrebbero essere necessari blocchi FFPE alternativi.
	Troppo RNA nel campione provoca una sovrastima della concentrazione del DNA.	Ripetere il trattamento RNase del campione di DNA e ripurificare il DNA.
	Termociclatore non calibrato	Verificare la calibrazione del termociclatore.
	Stampo non sufficiente	Aumentare il quantitativo di template.

**Nota:** Utilizzare DNA estratto da FFPE di alta qualità. Il DNA deve avere una concentrazione di 25 ng/μL come stabilito per assorbanza a 260 nm, deve presentare un rapporto di assorbanza a 260/280 nm, deve presentare un rapporto di assorbanza a 260/280 nm superiore a 1,8 ed essere DNA >90% (ovvero senza contaminazione di tRNA ed rRNA come verificato dal suo aspetto su un gel di agarosio). Conservare i campioni di DNA da -20 °C a -80 °C.

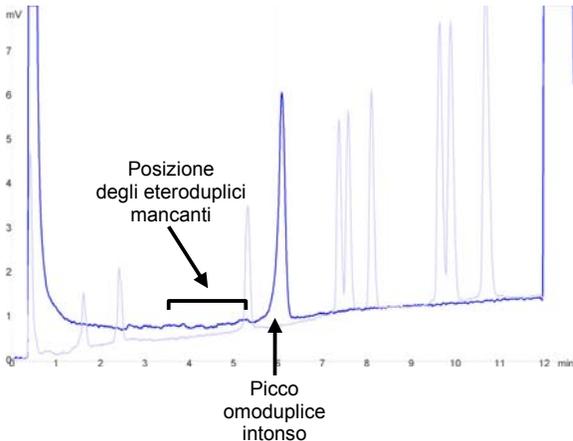
L'analisi di DNA stampo estratto da un tessuto incluso in paraffina richiede l'adozione di svariate precauzioni. Il DNA estratto può essere trattato con uracil-DNA glicosilasi al fine di prevenire l'amplificazione di frammenti di DNA contenenti residui C deaminati. Spesso un'elevata percentuale del materiale assorbente A<sub>260</sub> estratto da tessuto incluso in paraffina non viene ben amplificata durante la PCR. Utilizzando un abbondante quantitativo di DNA iniziale spesso si ottiene un prodotto di amplificazione adeguato. Un'altra considerazione sarebbe quella di scegliere sezioni tumorali FFPE con un'elevata percentuale di cellule tumorali. È possibile procedere anche a una microdissezione, ma questa opzione comporterebbe perdita di tempo e non sarebbe consigliata in generale nei test di laboratorio.

### Problema 2 – Prodotti PCR multipli quando analizzato su gel di agarosio

PRODOTTI PCR MULTIPLI	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
	<p>Temperatura di annealing troppo bassa</p>	<p>Verificare la calibrazione del termociclatore.</p>

**Nota:** la PCR deve dare come risultato un prodotto in quantità sufficiente (maggiore di 20 ng/μL) di un'**UNICA** specie amplificata di dimensioni corrette. **Utilizzare per la PCR DNA Polymerase e DNA Polymerase 10X PCR Buffer in dotazione con il kit.** Gli ampliconi dei controlli devono essere digeriti con SURVEYOR Nuclease quindi analizzati al fine di escludere un eventuale rumore di fondo spurio mediante confronto visivo dei profili dell'elettroferogramma (ved. **Esempi di Risultati, (Figura 4-10)**). Esaminare ciascun prodotto di DNA amplificato prima della digestione mediante elettroforesi su gel (con analisi di DHPLC System) per verificare la presenza di un'unica specie delle dimensioni previste.

### Problema 3 – Nessun prodotto di clivaggio riscontrato al momento dell'analisi dopo il trattamento di eteroduplici con SURVEYOR Nuclease

NESSUN PRODOTTO DI CLIVAGGIO	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
 <p>The chromatogram displays a baseline with several peaks. A prominent peak is observed at approximately 6.5 minutes, labeled 'Picco omoduplici intonso'. A smaller peak is visible at approximately 5.5 minutes, labeled 'Posizione degli eteroduplici mancanti'. The y-axis represents signal intensity in mV (0 to 7), and the x-axis represents time in minutes (0 to 12).</p>	<p>Proporzione di mismatch bersaglio troppo bassa</p> <p>Formazione inefficace di eteroduplici</p> <p>SURVEYOR Nuclease inattivo</p>	<p>Verificare il dosaggio utilizzando i controlli.</p> <p>Attenersi alla procedura PCR e di ibridizzazione corretta. Utilizzare DNA appena ibridizzato nella digestione di SURVEYOR Nuclease .</p> <p>Eeguire la nuova amplificazione PCR utilizzando (1) la stessa quantità di template di DNA; (2) aumentando l'ammontare di DNA iniziale; ovvero (3) isolare DNA fresco dalla stessa sezione FFPE o da una diversa.</p> <p>Eeguire la reazione Positive Control per verificare le prestazioni enzimatiche. Utilizzare esclusivamente Master Mix per SURVEYOR Nuclease appena preparate.</p>

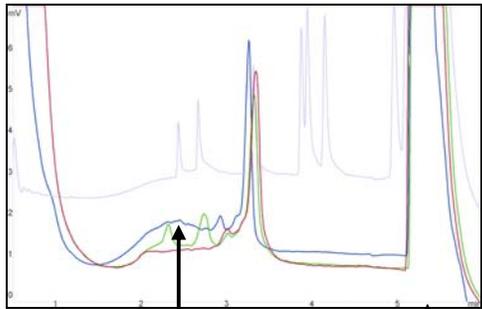
**Nota:** SURVEYOR Nuclease attua il taglio prevalentemente in corrispondenza dei mismatch negli eteroduplici. Il rapporto tra eteroduplici e omoduplici nel campione ibridizzato determinerà la dimensione del segnale di digestione con SURVEYOR Nuclease . In presenza di una mutazione del gene *KRAS* o *NRAS* ad una bassissima concentrazione nel campione di DNA genomico, il segnale potrebbe essere troppo basso per fornire un risultato positivo.

È importante far sì che la fase di ibridizzazione venga inclusa nel programma del termociclatore (vedere **Protocollo di Amplificazione**) per massimizzare l'efficacia della formazione di eteroduplici. Gli eteroduplici si formano in modo particolarmente inefficace durante reazioni PCR standard.

**Nota:** il rapporto segnale/rumore è generalmente sufficientemente alto da consentire la rilevazione di mutazioni anche a basse percentuali sul totale del template di DNA; è possibile infatti rilevare la presenza del 2% di DNA mutante. Le **figure 4-10** mostrano i prodotti della digestione ottenuti con DNA *KRAS* e *NRAS* Positive Control omoduplici ed eteroduplici (in dotazione con il kit) e i campioni FFPE su un sistema 4500 WAVE DHPLC. Sono chiaramente visibili i prodotti di clivaggio data la presenza di due nuovi picchi aventi le dimensioni previste che possono essere valutati in base al size marker del DNA.

**Attenzione:** i tamponi PCR disponibili sul mercato variano significativamente per contenuto e spesso i fornitori non ne specificano le formulazioni. Molti tamponi **NON** sono compatibili con SURVEYOR Nuclease a causa del pH o della presenza di additivi, surfattanti o altri ingredienti proprietari. **NON utilizzare altre polimerasi o tamponi per polimerasi 10X diversi da quelli in dotazione con il kit.**

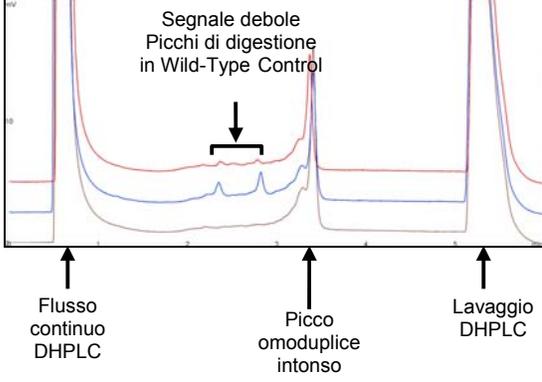
### Problema 4 – Sfondo elevato in seguito a trattamento con SURVEYOR Nuclease

SFONDO ELEVATO	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
	<p>Fase di ibridizzazione non ottimale</p> <p>Quantitativo di DNA troppo basso</p> <p>Prodotti PCR non specifici</p> <p>SURVEYOR Enhancer W2 e/o SURVEYOR Enhancer Cofactor hanno perso la loro efficacia</p>	<p>Procedere come segue:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Accertarsi che la concentrazione di DNA sia &gt;25 ng/μL.</li> <li>2. Ripetere la fase di formazione di eteroduplici, assicurandosi di attenersi alla procedura raccomandata; ved. 12.7.1.</li> </ol> <p>Verificare il prodotto e la qualità del template di DNA</p> <p>Verificare la resa e la qualità del DNA da amplificare.</p> <p>Controllare la data di scadenza del kit.</p>

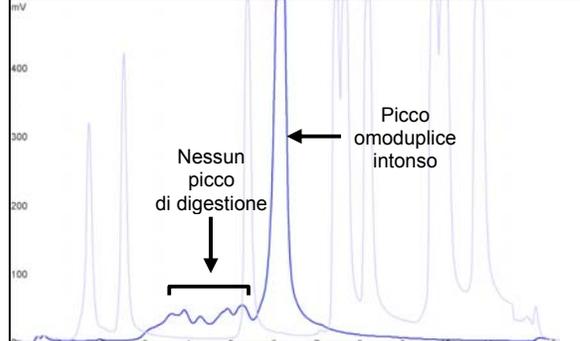
**Nota:** talvolta SURVEYOR Nuclease interagisce con il doppio filamento di DNA in punti a caso. per questo motivo si potrebbe generare un rumore di fondo al termine della digestione. Questa attività è soppressa dal SURVEYOR Enhancer W2 e dal suo Cofactor senza interferire negativamente in altro modo sulla reazione di clivaggio dei mismatch. SURVEYOR Enhancer W2 e SURVEYOR Enhancer Cofactor sono in dotazione con il kit e vanno sempre utilizzati.

Laddove ha luogo questa interazione si generano picchi di ridotte dimensioni sul sistema DHPLC. La digestione Wild-Type Control mostrerà questi stessi picchi minimi. Questo confronto serve a individuare le differenze nei pattern degli cromatogramma tra Wild-Type Control e il campione del test e per mettere a confronto il pattern del campione del test con quello del Wild-Type Control.

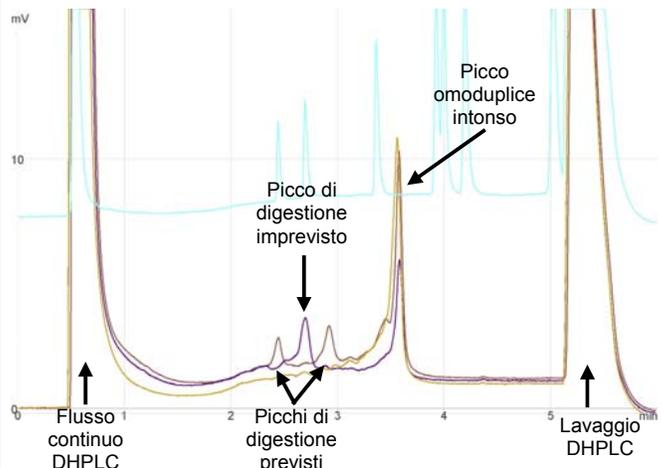
**Problema 5 – Picchi di digestione di SURVEYOR Nuclease in controlli negativi**

PICCHI DI DIGESTIONE IN CONTROLLI NEGATIVI	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
 <p>Segnale debole Picchi di digestione in Wild-Type Control</p> <p>Flusso continuo DHPLC</p> <p>Picco omoduplice intonso</p> <p>Lavaggio DHPLC</p>	<p>Contaminazione del contenuto del kit con ampliconi o controlli plasmidici del gene <i>KRAS</i> or <i>NRAS</i>.</p>	<p><b>Smaltire tutti i componenti del kit e utilizzarne uno nuovo.</b></p> <p>Rivolgersi all'assistenza tecnica Transgenomic Technical Support to discuss potential causes e chiedere spiegazioni delle potenziali cause e fonti di contaminazione.</p>

**Problema 6 – Risultati di SURVEYOR Nuclease falliti**

LA DIGESTIONE SURVEYOR NUCLEASE DI POSITIVE CONTROL È FALLITA	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
 <p>Nessun picco di digestione</p> <p>Picco omoduplice intonso</p>	<p>SURVEYOR Nuclease non è stata aggiunta.</p>	<p>Digerire un nuovo campione</p>
	<p>La digestione SURVEYOR Nuclease è stata eseguita alla temperatura sbagliata</p>	<p>Digerire un nuovo campione</p>

**Problema 7 – Picchi imprevisti nel tracciato di digestione di SURVEYOR Nuclease**

LA DIGESTIONE SURVEYOR NUCLEASE DI POSITIVE CONTROL È FALLITA	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
	<p>Mutazione presente in sito insolito</p>	<p>Sequenziamento di campione per verificare mutazione</p>

**Problema 8 – Contaminazione di campioni con Positive Control**

PATTERN DI DIGESTIONE INDICANTI LA PRESENZA DI REGIONE TIMBRATA DI POSITIVE CONTROL MISTI ED ETERODUPLICI WILD-TYPE	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE												
	<p>Tecnica di pipettatura scadente</p>	<p>Occorre fare molta attenzione nell'eseguire la pipettatura dei campioni per evitare la contaminazione incrociata.</p> <p>Controllare le regioni con sequenze di timbri di controllo per la contaminazione Positive Control .</p>												
<p>Sequenziamento indicante regioni del timbro <i>NRAS</i> Exon 2 che contaminano un campione del test.</p> <table border="0"> <tr> <td style="text-align: center;"> <p><b>Regione codone 12 e 13 di <i>NRAS</i> Exon 2</b></p> </td> <td style="text-align: center;"> <p><b>Regione "Timbro" controllo plasmidico di <i>NRAS</i> Exon 2</b></p> </td> <td></td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> <p>Il campione è Wild-Type È presente il sequenziamento del timbro <b>Contaminato</b></p> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> <p>Il campione è mutante Nessuna sequenza del timbro <b>Campione valido</b></p> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> <p>Il campione è Wild-Type Non è presente alcuna sequenza del timbro <b>Campione valido</b></p> </td> </tr> </table>	<p><b>Regione codone 12 e 13 di <i>NRAS</i> Exon 2</b></p>	<p><b>Regione "Timbro" controllo plasmidico di <i>NRAS</i> Exon 2</b></p>				<p>Il campione è Wild-Type È presente il sequenziamento del timbro <b>Contaminato</b></p>			<p>Il campione è mutante Nessuna sequenza del timbro <b>Campione valido</b></p>			<p>Il campione è Wild-Type Non è presente alcuna sequenza del timbro <b>Campione valido</b></p>	<p>Tecnica di pipettatura scadente</p>	<p>Occorre fare molta attenzione nell'eseguire la pipettatura dei campioni per evitare la contaminazione incrociata.</p> <p>Controllare le regioni con sequenze di timbri di controllo per la contaminazione Positive Control .</p>
<p><b>Regione codone 12 e 13 di <i>NRAS</i> Exon 2</b></p>	<p><b>Regione "Timbro" controllo plasmidico di <i>NRAS</i> Exon 2</b></p>													
		<p>Il campione è Wild-Type È presente il sequenziamento del timbro <b>Contaminato</b></p>												
		<p>Il campione è mutante Nessuna sequenza del timbro <b>Campione valido</b></p>												
		<p>Il campione è Wild-Type Non è presente alcuna sequenza del timbro <b>Campione valido</b></p>												

## Dettagli per gli Ordini

Numero di catalogo	Nome del prodotto	Formato
710104	SURVEYOR Scan <i>KRAS</i> Kit Exon 2 CE IVD	100 reazioni
710106	SURVEYOR Scan <i>KRAS</i> Kit Exons 3 & 4 CE IVD	100 reazioni
710400	SURVEYOR Scan <i>NRAS</i> Kit Exons 2, 3 & 4 CE IVD	100 reazioni
710077	CRC <i>RAScan</i> Combination Kit	230 reazioni

## Dettagli di contatto

### Corporate Headquarters

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

Telefono: (888) 233-9283\* o +1 (402) 452-5400

Fax: +1 (402) 452-5401

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

\*Solo in America del Nord

### Europe

Transgenomic Limited  
40 Watt Road  
Hillington Park, Hillington  
Glasgow G52 4RY  
United Kingdom

Telefono: +44 141 892 8800

Fax: +44 141 883 5967

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

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



## Traduzione Disclaimer

Transgenomic, Inc. ha compiuto ogni sforzo per assicurare l'accuratezza di questa traduzione. Se avete domande per quanto riguarda tutte le informazioni in questa versione tradotta del manuale, fare riferimento alla versione inglese *Instructions for Use for the CRC RAScan™ Combination Kit for DHPLC Systems – 482427(EN)* <http://world.Transgenomic.com/files/literature/482427-EN.pdf> e / o contatto Transgenomic a [support@transgenomic.com](mailto:support@transgenomic.com).

## Licenze, Marchi e Copyright

**SURVEYOR Nuclease:** Il presente prodotto è realizzato sotto licenza esclusiva dei brevetti US Patents 6,699,980, 6,391,557, 5,869,245, i corrispondenti brevetti per l'estero e altri brevetti in attesa di autorizzazione. L'uso di SURVEYOR Nuclease necessita di una licenza rilasciata da Transgenomic. L'acquisto del presente prodotto da parte di organizzazioni accademiche, no-profit e for-profit concede loro diritti limitati all'uso di SURVEYOR Nuclease a scopi di ricerca. È severamente vietato rivendere il presente prodotto o utilizzarlo per altri scopi. Per maggiori informazioni rivolgersi a Transgenomic.

**DNA Polymerase:** l'uso del presente prodotto è coperto da uno o più dei seguenti brevetti US e dalle corrispondenti rivendicazioni di brevetto al di fuori degli Stati Uniti: 5.789.224, 5.618.711, 6.127.155 nonché rivendicazioni al di fuori degli Stati Uniti corrispondenti al brevetto US n. 4.889.818. L'acquisto del presente prodotto implica una garanzia limitata e non trasferibile contro azioni legali in virtù delle suddette rivendicazioni di brevetto in merito all'utilizzo del solo quantitativo di prodotto che l'acquirente ha a disposizione per le proprie ricerche interne. Non viene concesso, né espressamente, né implicitamente o per preclusione, alcun altro diritto in virtù di altre rivendicazioni di brevetto (quali le rivendicazioni che coprono il processo brevettato della 5' nucleasi con brevetti US n. 5,210,015 e 5,487,972), nessun diritto ad applicare qualsivoglia metodo brevettato né nessun diritto ad eseguire servizi commerciali di alcun tipo, compresi, senza alcuna limitazione, la divulgazione a scopo di lucro dei risultati delle attività svolte dall'acquirente o altre considerazioni commerciali. Questo prodotto ha solo scopo di ricerca. Gli utilizzi diagnostici in virtù dei brevetti Roche necessitano di una licenza a parte rilasciata da Roche. Per maggiori informazioni sull'acquisto di licenze rivolgersi a Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Transgenomic, SURVEYOR e WAVE sono marchi registrati, mentre Navigator, CRC RAScan, il logo con l'elica e Advancing Personalized Medicine sono marchi di Transgenomic, Inc. Tutti gli altri marchi appartengono ai rispettivi proprietari.

© 2013 Transgenomic, Inc. Tutti i diritti riservati. Stampato negli Stati Uniti

**Documento N. 482427(IT) rev-00**