



IntellMed, s.r.o.

IntellMed, s.r.o., Šlechtitelů 21, 78371 Olomouc

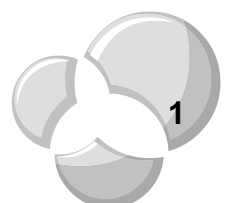
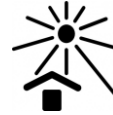
IČ: 27780317 DIČ: CZ27780317

sales@intellmed.eu

NÁVOD K POUŽITÍ PRO KIT BRAF P.VAL600GLU



IntellMed, s.r.o.
Šlechtitelů 21
78371 Olomouc
IČ: 27780317
DIČ: CZ27780317



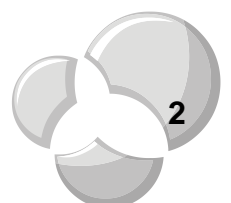


IntellMed, s.r.o.

IntellMed, s.r.o., Šlechtitelů 21, 78371 Olomouc

IČ: 27780317 DIČ: CZ27780317

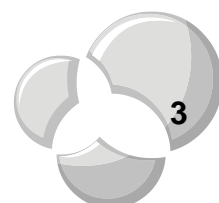
sales@intellmed.eu





OBSAH

Návod k použití pro Kit BRAF p.Val600Glu	1
1. Úvod	4
1.1 Označení	4
1.2 Rozsah použití	4
1.3 Testovaná položka	4
1.4 Stanovované veličiny	4
1.5 Přístroje a zařízení	4
1.6 Standardy a referenční materiály	4
1.7 Podmínky prostředí	5
2. Postup	6
2.1 Vývojový diagram metody	6
2.2 Preanalýza	7
2.3 Kontrola před analýzou	7
2.4 Vlastní postup	7
2.5 Kontrola v průběhu analýzy	8
2.6 Metody záznamu výsledků	9
2.7 Bezpečnostní opatření	9
3. Hodnocení	10
3.1 Algoritmus hodnocení	10
3.2 Kritéria zamítnutí	10
3.3 Zaznamenání údajů, analýza, prezentace	10
3.4 Nejistota měření	10





1. ÚVOD

1.1 OZNAČENÍ

Vyšetření molekulárně genetických změn DNA metodou PCR s fluorescenčním měřením nárůstu amplikonu v reálném čase ve dvou fluorescenčních kanálech.

1.2 ROZSAH POUŽITÍ

Jakákoliv lidská DNA o dostatečné kvalitě (nedegradovaná, nemodifikovaná chemicky), u které lze očekávat mutaci v genu *BRAF* a jejíž vyšetření má diagnostický, prognostický nebo prediktivní význam (např. karcinom kolorekta, melanom).

1.3 TESTOVANÁ POLOŽKA

Gen *BRAF* v lidské DNA, kodon 600.

1.4 STANOVOVANÉ VELIČINY

BRAF

Test je určen k detekci bodové mutace p.Val600Glu v minimálně jednoprocenním zastoupení ve standardní DNA.

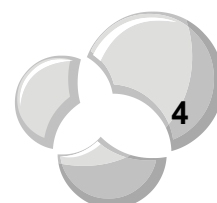
1.5 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Pro řezání bločků a přípravu DNA: mikrotom, vyhřevný blok, digestoř, vortex, centrifuga, spektrofotometr Nanodrop, nastavitelné pipety, plastový spotřební materiál

Pro amplifikaci: termocyklér s měřením fluorescence v reálném čase LightCycler 480 II anebo cobas, vortex, minicentrifuga, centrifuga pro mikrotitrační destičky a PCR plátky, chladící stojánky, nastavitelné pipety, pipetovací box, plastový spotřební materiál

1.6 STANDARDY A REFERENČNÍ MATERIÁLY

Pozitivní kontrola: Vzorek se známým *BRAF* mutačním statusem, dodávaný jako součást typizační soupravy nebo jakákoliv jiná DNA s přinejmenším 1 % mutovaného *BRAF* p.Val600Glu. Negativní kontrola: Vzorek bez *BRAF* mutace (jakákoliv DNA izolovaná z krve zdravé osoby).

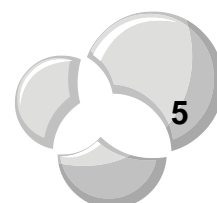




1.7 PODMÍNKY PROSTŘEDÍ

Na pracovní prostředí pro nejsou kladeny žádné zvláštní podmínky odlišující se od běžných molekulárně biologických laboratorních podmínek (zavedení protikontaminačních opatření včetně fyzického oddělení prePCR a PCR/postPCR areálu).

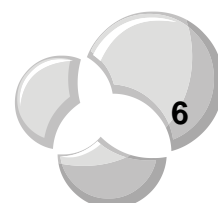
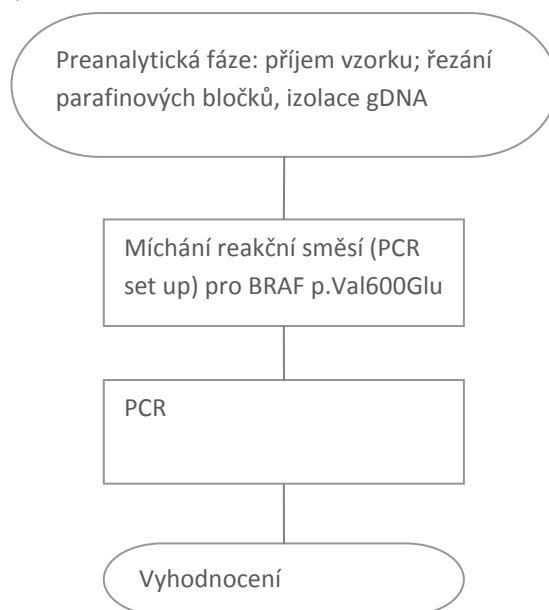
Parafinové řezy a cytologické preparáty jsou uchovávány v pořadači při pokojové teplotě nebo v mrazničce. Čerstvě zamražené tkáně nebo tkáně v RNA later jsou uchovávány nejlépe při -70 až -80°C (RNA later lze uchovávat i při pokojové teplotě). Izolovaná i amplifikovaná DNA jsou uchovávány v označených zkumavkách při -10 až -20°C. Parafinový řez je uchováván krátkodobě při pokojové teplotě, dlouhodobě při -10 až -20°C, při archivaci při pokojové teplotě. Biologický materiál je zpracováván s použitím ochranných rukavic. Pro cyklér musí být splněny podmínky teploty a vlhkosti stanovené výrobcem.





2. POSTUP

2.1 VÝVOJOVÝ DIAGRAM METODY





2.2 PREANALÝZA

Není součástí testu.

2.3 KONTROLA PŘED ANALÝZOU

Kontroluje se, zda jsou k dispozici veškeré potřebné přístroje a reagentie (a údaje o vzorku). Kontrolujeme, zda máme dostatečné množství DNA (na základě spektrofotometrického nebo fluorescenčního odhadu koncentrace a čistoty, na základě výsledků předchozího PCR testování).

2.4 VLASTNÍ POSTUP

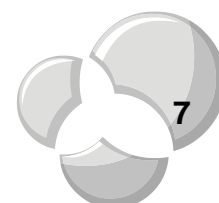
Reagentie vystavujeme světlu jen na nejnutnější dobu, jinak je před světlem chráníme. Používáme DNA s koncentrací 20 až 200 ng/μl. Rozpis pro 13 testovaných vzorků:

- 1 pozitivní kontrola – DNA s mutací
- 2 negativní kontrola – DNA bez mutace
- 3 beztemplátová kontrola – voda místo DNA nebo lépe izolát z parafinu bez biotického vzorku
- 4 vzorek 1
- 5 vzorek 2
- 6 vzorek 3
- 7 vzorek 4
- 8 vzorek 5
- 9 vzorek 6
- 10 vzorek 7
- 11 vzorek 8
- 12 vzorek 9
- 13 vzorek 10
- 14 vzorek 11
- 15 vzorek 12
- 16 vzorek 13

Smícháme 3,4 μl Taq + 157 μl H₂O

Rozpipetujeme šestnáctkrát po 8,5 μl do zkumavek s vysušenou směsí

Zamícháme pipetováním špičkou tam a zpět (můžeme stejnou špičkou)





Přidáme 0,5 µl DNA dle rozpisu

Uzavřeme zkumavky

Stojánek krátce zvortexujeme

Stočíme

Nasadíme na BRAF program

95°C 15´

(95°C 15´´/65°C 50´´/72°C 20´´)*50

37°C 1´´

2.5 KONTROLA V PRŮBĚHU ANALÝZY

Pracovník pověřený vyhodnocením vzorků průběžně kontroluje průběh vyšetření v těchto krocích:

Kontrola amplifikovatelnosti DNA

Na základě spektrofotometrických údajů anebo na základě výsledků testovací PCR můžeme vyšetření zastavit s výsledkem „nelze vyhodnotit“.

Vnitřní kontrola

V každé zkumavce je nezávislý primerový pár, fluorescenčně označený pro JOE/HEX kanál. Tento primerový pár má jako templát gen globin, který je konstitutivně přítomen u každého lidského jedince. Tato kontrola má být pozitivní, pokud je ve vzorku amplifikovatelná lidská DNA.

Negativní kontrola izolace a negativní kontrola PCR reakce

Postup izolace DNA a samotné PCR je aplikován na čistý parafin (bez přítomnosti DNA). Pokud je tato kontrola pozitivní, je nutno analýzu provést znovu z nového parafinového řezu a zároveň rozlišit, zdali k případné kontaminaci došlo během přípravy DNA ze vzorku nebo během PCR setup - v PCR reagentech (přidáme do PCR setup „no template“ kontrolu s vodou místo DNA).

Pozitivní kontrola

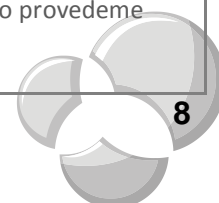
DNA s prokázanou mutací *BRAF* p.Val600Glu.

Externí kontrola

Spoluprací s jinými pracovišti a s organizátory MPK jsou vyšetřovány anonymizované vzorky a po provedení je porovnávána nalezená mutace a její lokalizace.

Problémy při PCR

Problém	Pravděpodobně způsobeno	Možné řešení
Žádný amplikon po PCR, pozdní zdvih amplifikační	Špatná kvalita DNA, chyba při izolaci, chyba při PCR set up	Opakujeme izolaci ze stejného vzorku nebo provedeme izolaci z nového vzorku.





křivky		
Amplifikace v některé z negativních kontrol (voda místo DNA, čistý parafin místo FFPE)	Kontaminace během přípravy templátu nebo během přípravy PCR	Hledání zdroje kontaminace: výměna levných reakčních komponent, vyčištění pracovní plochy přípravkem ničícím DNA, případné vyčištění pipet a opakování celého postupu PCR s přidáním no template control (voda místo DNA), popřípadě opakování od izolace z čistého parafinu

2.6 METODY ZÁZNAMU VÝSLEDKŮ

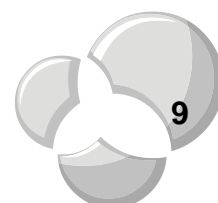
Archivace všech protokolů v provozním deníku, počítačové uložení výsledků pomocí software Roche LC480 a cobas, tisk výsledkových protokolů ze software Roche a cobas.

Zápis vizuálně odečtených dat do formuláře, nalepení do provozního deníku.

2.7 BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Rizikové látky: biologický materiál

Každý biologický materiál je brán jako potenciálně infekční. Při práci je nutno používat vhodnou ochranu (jednorázové rukavice). Dále platí všeobecné zásady bezpečnosti práce v molekulárně biologické laboratoři.





3. HODNOCENÍ

3.1 ALGORITMUS HODNOCENÍ

Po skončení PCR provedeme vyhodnocení příkazem Abs Quant/Fit points. Sledujeme HEX/JOE (filter comb 533 – 580) a FAM (filter comb 465-510) signál.

- Pokud je v negativní kontrole NTC Ct signál HEX/JOE nižší než 38 nebo pokud je v negativní kontrole (standardní, nemutované DNA) signál (Ct FAM – Ct HEX/JOE) < 6 obdobně jako v pozitivní kontrolní DNA s mutací, je běh kontaminován a neplatný.
- Pokud je hodnota Ct v kanálu HEX/JOE vyšší než 38 nebo je nulová, není vzorek analyzovatelný.
- Pokud Ct HEX/JOE je nižší než 32 a Ct FAM je vyšší než Ct HEX o více než 9 cyklů, není prokázána mutace BRAF p.Val600Glu.
- Pokud Ct HEX/JOE je nižší než 32 a Ct FAM je vyšší než Ct HEX o více než 6 ale méně než 9 cyklů, je nutno vyšetření opakovat. Při obdržení stejného nebo průkaznějšího výsledku uzavíráme, že mutace BRAF p.Val600Glu je prokázána.
- Pokud je Ct HEX/JOE nižší než 38 a Ct FAM je nižší než Ct HEX/JOE nebo je Ct HEX/JOE nižší než 34 a Ct FAM vyšší o méně než 6 cyklů, mutace BRAF p.Val600Glu je prokázána.

3.2 KRITÉRIA ZAMÍTNUTÍ

Pozitivní výsledky zamítáme pro celý běh, pokud se objeví pozitivní signál i u „no template“ kontroly. Výsledek uzavíráme jako „nelze“, pokud u konkrétního vzorku chybí signál jak ve FAM, tak v JOE/HEX kanálu.

3.3 ZAZNAMENÁNÍ ÚDAJŮ, ANALÝZA, PREZENTACE

Záznam provádíme pomocí firemního software. Díky softwaru analyzujeme hrubá data naměřené fluorescence a porovnáváme získané sekvence se standardními nemutovanými sekvencemi.

3.4 NEJISTOTA MĚŘENÍ

Metoda pro *BRAF* je schopna zachytit mutaci i v případě 1% zastoupení mutace ve vzorku, ale vzhledem k možnosti kvantitativního zkreslení každý pozitivní výsledek s delta Ct mezi 6 a 9 cyklů opakujeme z nového mikrotomového řezu nebo ze stejné DNA.

