

ELUCIGENE™ Ashplex 1



Amplification Refractory Mutation System (ARMS™) skyddas av europeiskt patent nr 0332435, amerikanskt patent nr 5595890 och motsvarande globala patent.

ARMS™ är ett varumärke som tillhör AstraZeneca UK Ltd. och används under licens.

ELUCIGENE™ är ett varumärke som tillhör Tepnel Diagnostics Ltd.

NuSieve® är ett varumärke som tillhör Cambrex BioScience. AmpliTaq Gold® är ett varumärke som tillhör Roche Molecular Systems Inc.

ELUCIGENE™ kit har utvecklats och tillverkas av Tepnel Diagnostics Ltd enligt kvalitetssystem som ackrediterats i enlighet med ISO 9001:2000 och ISO 13485 (EN 46001).

Tepnel Diagnostics Ltd
12 Blacklands Way
Abingdon Business Park
Abingdon
Oxfordshire
OX14 1DY
Storbritannien

För kundsupport:

E-post elucigene@tepneldiagnostics.co.uk

AS008BY/006SE
05/2006
Copyright © 2003 Tepnel Diagnostics



ELUCIGENE™ Ashplex 1

Katalognummer - AS008B2 – 50 tester

Användningsområde

För samtidig kvalitativ detektion *in vitro* av mutationer i gener vid Tay-Sachs' sjukdom, Canavans sjukdom, familjär dysautonomi och fanconianemi i flytande helblod (EDTA), torkade blodfläckar och munsköljningsprover vid laboratorier som innehar servicelicens för polymeraskedjereaktion (PCR) från F. Hoffman-La Roche och/eller Roche Molecular Systems, Inc.

Principer för förfarandet

Den metod som används av ELUCIGENE™-testerna baseras på teknologin Amplification Refractory Mutation System (ARMS™), som kan påvisa punktmutationer eller små deletioner i deoxiribonukleinsyra (DNA) ⁽¹⁾.

Varningar och försiktighetsåtgärder

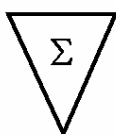
1. Dessa ELUCIGENE™-reagens är avsedda för yrkesmässig *in vitro*-diagnostisk testning. Produkten tillhandahåller inte någon licens under de PCR-patent som innehas av F. Hoffman-La Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Diagnostics, CH-4070 Basel, Schweiz) och Roche Molecular Systems, Inc (Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501).
2. Den normala DNA-kontroll som levereras tillsammans med detta kit har humant ursprung och har genomgått oberoende tester med en PCR-baserad analys och befunnits vara negativ för hepatit B-virus (HBV), hepatit C-virus (HCV) och humant immunbristvirus 1 (HIV1).
3. Var försiktig vid hantering av material av humant ursprung. Alla prover ska anses vara potentiellt smittsamma. Ingen testmetod kan garantera fullständig frånvaro av HBV, HCV, HIV 1 eller andra smittsamma agens. Följ gällande bestämmelser för biologiskt riskmaterial beträffande hantering av prover och testkomponenter samt användning, förvaring och kassation av dem.
4. Det kan erfordras licenser för att utföra *in vitro*-diagnostisk analys av genmutationer som detekteras av dessa reagens. Köparen av reagenset ansvarar själv för sådana eventuella licenser.
5. Denna produkt ska valideras med laboratoriets procedurer före diagnostisk användning.

Symboler på etiketter

Dessa symboler som används på alla etiketter och förpackningar överensstämmer med den harmoniserade standarden EN 980.



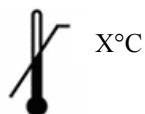
Tillverkare



Antal tester



Se bruksanvisningen



Förvaras kallare än angiven temperatur



Används före angivet datum



Katalognummer



Lot- eller partinummer

Material som medföljer

Reagensen ska förvaras på en plats som är fri från kontaminerande DNA- eller PCR-produkt.

Använd inte reagensen efter det utgångsdatum som anges på förpackningsetiketten. Alla reagens levereras bruksfärdiga. Förvara oöppnade och öppnade tester i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Öppnade reagens kan förvaras i upp till 3 månader.

Tillräckligt material för 50 tester medföljer:

1. 2 ampuller primermix (TA) innehållande primrar för detektion av följande mutationer som förknippas med Tay-Sachs i hexosaminidas A-genen (G269S, 1278insTATC, IVS12+1G>C), Canavans sjukdom i aspartoacylasgenen (693C>A och 854A>C), familjär dysautonomi i IKBKAP-genen (2507+6T>C och R696P), fanconianemi i FACC-genen (IVS4+4A>T) samt deoxinukleotidtrifosfater i buffert (2 x 450 μL). (AS008TA)
2. 1 ampull x 200 μL CR000TV spädningsbuffert (DB).
3. 1 ampull x 600 μL CR000TR laddningsfärg (LD).
4. 1 ampull x 50 μL AS008TX DNA-kontroll (DC), normal för de mutationer som påvisas av ELUCIGENE™ Ashplex 1.

Material som behövs men inte medföljer

Laboratorieförbrukningsmaterial: handskar, mikrofugrör med skruvkork, pipettspetsar, tunnväggiga 0,2 mL eller 0,5 mL PCR-rör.

DNA-preparation: Sterilt avjoniserat vatten av god kvalitet, natriumklorid (NaCl), dinatriumsalt av etylendiamintetraättisyra (EDTA), natriumhydroxidpellets (NaOH), kristalliserad 2-amino-2-(hydroximetyl)-1,3-propandiol (Tris-bas), saltsyra (HCl) 36 % densitet 1,18, ammoniumklorid (NH_4Cl).

PCR-amplifiering: Sigma lätt vit mineralolja*, sterilt destillerat vatten av god kvalitet, AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems).

Elektrofores: Material för gelelektrofores bestående av NuSieve® 3:1 agaros (Cambrex Bio Science) och 50 basparsstege (Amersham GEHealthcare), etidiumbromid, glycerol, bromfenolblått.

* För amplifiering som utförs i 0,5 mL PCR-rör eller värmecykler utan uppvärmda lock.

Utrustning som behövs

Laboratorieutrustning: precisionspipetter (2 satser: 1 för hantering pre-amplifiering och 1 för hantering post-amplifiering, helst pipetter med positiv förskjutning), glas, skyddskläder, vortexblandare, mikrofug, våg, rörställ.

DNA-preparation: Centrifug (för munsköljningsprover), värmeblock (uppvärmning till $100\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Amplifiering: Värmeocykel som rymmer 0,5 mL eller 0,2 mL rör (med en temperaturnoggrannhet på +/-1 °C mellan 33 °C och 100 °C och statisk temperaturjämnhet på +/-1 °C), valfritt med uppvärmt lock.

Elektrofores: Horisontell submarin geltank, strömförsörjningsdel, mikrovåg, vattenbad för kylning av agaros, UV-transilluminator, fotografiskt system.

Provtagning och förvaring av prover

Helblodprover (EDTA), blodfläckar eller munsköljningsprover ska användas. Den person som ska testas bör avstå från att äta eller dricka omedelbart innan munsköljningsprovet lämnas.

Provtagningsutrustning har ibland rapporterats ha skadlig inverkan på vissa analyter och kan störa vissa metodteknologier ⁽²⁾. Användaren bör tillförsäkra att den valda utrustningen används enligt tillverkarens anvisningar och att både provtagningsutrustning och alternativa DNA-preparationsmetoder är kompatibla med testet.

Blodprover ska förvaras i -20 °C före preparation av DNA. Undvik upprepad frysning och tining. Munsköljningsprover ska förvaras i 4 °C och DNA-preparation ska utföras inom 7 dagar.

Preparation av DNA från helblodprover (EDTA)

1. Pipettera 80 µL av varje blodprov i ett mikrofugrör med skruvkork.
2. Pipettera 320 µL 170 mM (9,09 g/L) NH₄Cl-lösning i varje rör.
3. Blanda i 20 minuter genom att försiktigt snurra och vända. Undvik kraftig omrörning och skumbildning.
4. Centrifugera varje rör i 2 minuter vid 12 000 g tills en cellpellet bildas.
5. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
6. Pipettera 300 µL 10 mM (0,58 g/L) NaCl/10 mM (3,72 g/L) EDTA i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
7. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en cellpellet bildas.
8. Upprepa steg 5 till 7 minst ytterligare två gånger tills all synlig röd färg i supernatantvätskan har avlägsnats.
9. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
10. Pipettera 200 µL 50 mM (2 g/L) NaOH-lösning i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
11. Inkubera i värmeblock vid 100 °C i 10 minuter.
12. Pipettera 40 µL 1 M (121,1 g/L) Tris-bas/HCl (pH 7,5) i varje rör och vortexa.
13. Tillsätt 1 mL sterilt avjoniserat vatten till varje mikrofugrör så att en total DNA-provvolym på 1,24 mL erhålls.

14. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en pellet av cellfragment bildas. Supernatantvätskan innehåller DNA.

Preparation av DNA från munsköljningsprover

1. Skölj runt 10 mL 0,9 % koksaltlösning i munnen i 20 sekunder. Samla suspensionen i ett sterilt universalrör av plast.
2. Pelletera cellerna genom centrifugering vid 800 g i 10 minuter i 18–28 °C.
3. Avlägsna och kassera supernatantvätskan försiktigt med hjälp av en pipett.
4. Pipettera 500 µL 10 mM (0,58 g/L) NaCl/10 mM (3,72 g/L) EDTA i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
5. Överför varje prov till ett mikrofugrör med skruvkork.
6. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en cellpellet bildas.
7. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
8. Pipettera 500 µL 50 mM (2 g/L) NaOH-lösning i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
9. Inkubera i värmeblock vid 100 °C i 10 minuter.
10. Pipettera 100 µL 1 M (121,1 g/L) Tris-bas/HCl (pH 7,5) i varje rör och vortexa.
11. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en pellet av cellfragment bildas. Supernatantvätskan innehåller DNA.
12. Överför 100 µL av supernatanten (DNA-prov) till ett nytt, märkt mikrofugrör.
13. Tillsätt 400 µL sterilt avjoniserat vatten till varje DNA-prov så att en total volym på 500 µL erhålls.

Preparation av DNA från torkade blodfläckar

1. Stansa ut rondeller på 2 x 3 mm^(b) från provkort i ett 1,5 mL rör med skruvkork.

Fläckarna ska stansas ut från ett område på kortet som är helt mättat med blod.

Stansa flera ”rena” kortfläckar som avfall före varje prov för att förhindra smitta mellan prover.
2. Tillsätt 1 mL 10 mM (0,58 g/L) NaCl/10 mM (3,72 g/L) EDTA och blanda i rotationsblandare i 15–20 minuter. Om rotationsblandare inte finns tillgänglig, kan tvättarna behöva utökas till upp till 30 minuter vardera.
3. Avlägsna och kassera tvättlösningen.
4. Upprepa steg 2 och 3 ytterligare en gång.
5. Nu bör det mesta av hempigmentet vara eluerat från rondellen. En svag röd-brun färgning av blodfläckarna är inte ovanlig på detta stadium.

6. Kör kort i mikrofug (3 s) så att återstående tvättlösning i botten av röret samlas upp. Avlägsna och kassera så mycket tvättlösning som möjligt med hjälp av en pipett, utan att störa fläckarna.
7. Detta korta mikrofugsteg avlägsnar vanligtvis ytterligare hempigment från blodfläckarna.
8. Tillsätt 150 µL 50 mM (2 g/L) NaOH till varje rör. Blanda genom att knäppa försiktigt med fingret.
9. Inkubera i värmeblock vid 100 °C i 10 minuter.
10. Kör kort i mikrofug så att supernatanten i botten av röret samlas upp.
11. Tillsätt 30 µL 1 M (121,1 g/L) Tris-bas/HCl (pH 7,5) till varje rör för att neutralisera och blanda noga.
12. Tillsätt 420 µL sterilt Sigma-vatten till varje DNA-prov så att en total volym på 600 µL erhålls.
13. Blanda proverna väl och samla upp i mikrofug.
14. Överför supernatanten till ett nytt märkt rör med skruvkork.
15. Förvara extraherat DNA vid –20 °C.

^(b) Det totala området blodprov som används ska motsvara minst 2 x 3 mm cirkulära blodfläckar. Till exempel kan 1 x 6 mm kortfläckar användas om det är lämpligt.

QIAmp® DNA-blodkit (Qiagen) har även använts för DNA-preparation från flytande helblod och har befunnits ge reproducerbara och tolkningsbara resultat

Obs!

De DNA-preparationsmetoder som beskrivs ovan rekommenderas av Tepnel Diagnostics och har visat sig ge konsekventa och tillförlitliga resultat. DNA som prepareras med andra metoder eller från andra provtyper är eventuellt inte optimalt för ELUCIGENE™ Ashplex 1-testet och kan ge suboptimala resultat. De viktigaste kriterierna för alternativa DNA-preparationsmetoder är optimal DNA-koncentration och frånvaro av PCR-hämmare.

Alternativa metoder och provtyper bör noga utvärderas med ELUCIGENE™ Ashplex 1-testet innan resultaten används för diagnostik. Tester av DNA-prover vid koncentrationer <10 ng/5 µL rekommenderas inte. Vid optimala PCR-förhållanden erhålls konsekventa resultat vid DNA-koncentrationer mellan 10 och 100 ng/5 µL.

Testprotokoll - amplifieringsförfarande

Siffrorna i tabell 1 och 2 kan ökas proportionellt för andra antal tester än de angivna. Med hänsyn till de små volymer det gäller rekommenderar Tepnel Diagnostics att minst 5 tester prepareras åt gången.

1. Programmera värmecykeln med en tidsfördröjningsfil som aktiverar AmpliTaq Gold vid 94 °C i 20 minuter, länkad till ett amplifieringscykelprogram på 30 sekunder vid 94 °C (denaturering), 1 minut vid 61 °C (annealing) och 1 minut vid 72 °C (extension) i 35 cykler.

Detta bör länkas till en 30-minuters tidsfördröjningsfil vid 72 °C (extension) på den slutliga cykeln.

2. Tina och centrifugera ampullerna innehållande primermix (TA), AmpliTaq Gold (medföljer ej), spädningsbuffert (DB) och laddningsfärg (LD) i 10 sekunder vid 12 000 g, blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera ampullerna igen i 10 sekunder.

Obs! Steg 3–5 måste utföras i ett utrymme som är fritt från DNA

3. Med ledning av tabell 1 bereds tillräcklig spädning av AmpliTaq Gold i medföljande spädningsbuffert och sterilt destillerat vatten för det antal prover och kontroller som ska testas. **Blanda väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.**

Tabell 1. Spädning av AmpliTaq Gold i spädningsbuffert

	Antal erforderliga tester			
	10	20	30	40
Volym sterilt destillerat vatten (µL)	21	42	63	84
Volym spädningsbuffert (µL)	6	12	18	24
Volym laddningsfärg (µL)	30	60	90	120
Volym AmpliTaq Gold (µL)	3	6	9	12
Total volym (µL)	60	120	180	240

4. Bered reaktionsblandningen med ledning av tabell 2. Pipettera rätt portion av primermix i ett märkt mikrofugrör. Använd en ny pipettspets och tillsätt rätt volym av AmpliTaq Gold-spädningen (från steg 3) till mikrofugröret. Blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera röret i 10 sekunder vid 12 000 g.

Tabell 2. Beredning av reaktionsblandningar

	Antal erforderliga tester			
	10	20	30	40
Volym primermix (µL)	165	330	495	660
Volym spädd enzym (µL)	55	110	165	220
Total volym (µL)	220	440	660	880

5. Pipettera 20 µL av den beredda A-reaktionsblandningen i botten av vart och ett av rätt antal märkta PCR-rör.
6. Använd separat pipettspets varje gång och tillsätt 5 µL test-DNA-prov eller DNA-kontroll (DC) i varje rör. Tillsätt en droppe Sigma lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.
7. Tillsätt inget DNA till rör med negativ kontroll. Tillsätt 1 droppe Sigma lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.
8. Centrifugera rören i 10 sekunder vid 12 000 g.
9. Placera alla rör stadigt i värmecykelblocket. Starta först 94 °C tidsfördröjningsfilen och sedan amplifieringscykelprogrammet.

10. Kassera all återstående oanvänd AmpliTaq Gold-spädning och beredd reaktionsblandning.
11. När amplifieringscykelprogrammet är avslutat, kan proverna förvaras i rumstemperatur över natt eller i 2–8 °C i upp till 7 dagar före analys med gelelektrofores.

* För amplifiering som utförs i 0,5 mL PCR-rör eller värmecykler utan uppvärmda lock.

Gelelektrofores

Användaren bör säkerställa att den valda utrustningen används i enlighet med tillverkarens anvisningar och är kompatibel med detta test. I detta sammanhang är de viktigaste parametrarna gelmatrisen och måtten på kammen (brunnsformaren). Resultat har erhållits med nedanstående elektroforesförhållanden:

1. PCR-produkten elektroforesbehandlades i 3 % NuSieve® 3:1 agarosgel med hjälp av trisborat med etidiumbromid (TBE/EtBr) som löpande buffert. TBE/EtBr bereddades som 134 mM (16,2 g/L) Tris-bas, 74,9 mM (4,63 g/L) borsyra, 2,55 mM (0,95 g/L) EDTA-buffert med 0,1 µg/mL etidiumbromid.
2. 3 g NuSieve® 3:1 upplöstes i 100 mL TBE/EtBr och hälldes i en 15 x 12 cm horisontell gelbricka med 1,5 mm x 5 mm brunnsformar upphängda 1 mm ovanför botten.
3. 15 µL av PCR-produkten från PCR-röret laddades i intilliggande brunnspositioner på den förberedda agarosgelen.
4. En 50 basparsstege (Amersham GEHealthcare) på 1,5 µg/15 µL bereddades i den medföljande laddningsfärgen (80 µL destillerat vatten/10 µL laddningsfärg/10 µL 50 basparsstege) och 15 µL laddades intill varje rad av laddade prover på gelen som en molekylviktsmarkör.
5. Elektroforesen utfördes vid 5 till 6 V/cm mellan elektroderna tills färgen hade vandrat 5 cm från laddningsbrunnarna mot anoden (1,5 till 2 timmar).
6. Efter elektroforesen placerades gelbrunnarna på en UV-transilluminator vid 260 nm, visualiserades och fotograferades.

Tolkning av resultat

PCR-produkterna iakttogs som band i gelens rörspår.

1. De övre & undre kontrollbanden måste vara tydligt synliga i alla prover (se figur 1).
2. De övre och undre kontrollbandens position ska ange rätt molekylstorlek (se figur 1).
3. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna G269S, 1278insTATC, IVS12+1G>C, 693C>A, 854A>C, 2507+6T>C, R696P eller IVS4+4A>T iakttas som band och identifieras genom att positionen för varje band jämförs med ett intilliggande markörspår. Produktbandstorlekarna i baspar (bp) visas i figur 1.
4. Den negativa kontrollen visar inte några band inom det område som anges av de övre och undre kontrollbanden.

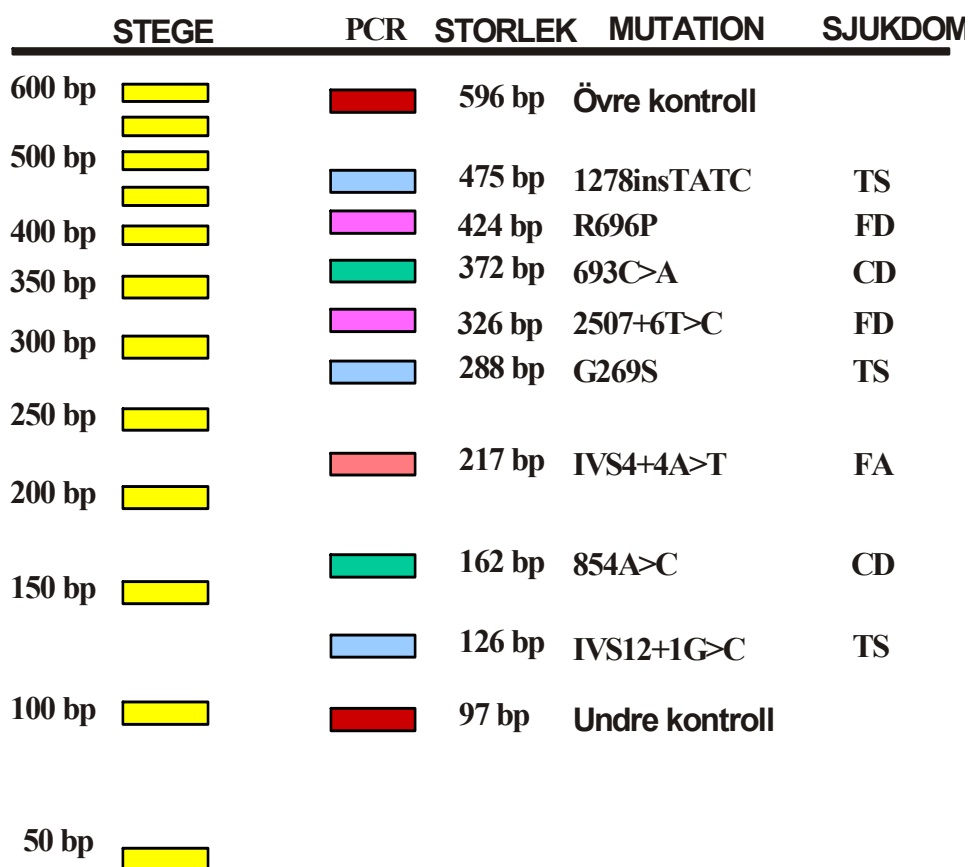
Prestandaegenskaper

Validering av testet

Etthundratjugo prover testades i en företagsintern studie. Samtliga prover var helblod (EDTA) och DNA preparerades med hjälp av QIAamp® 96 DNA-blodkit (Qiagen). Alla erhållna resultat konfirmerades externt. Av de 120 personer som testades var 86 normala, 2 hade IVS12+1G>C, 3 hade 854A>C, 3 hade IVS4+4A>T, 2 hade G269S, 3 hade 2507+6T>C, 2 hade 693C>A, 3 hade R696P och 4 hade 1278insTATC. 10 sammansatta heterozygoter påvisades även:

2507+6T>C /1278insTATC (3)	2507+6T>C /693C>A
854A>C /2507+6T>C	IVS4+4A>T /2507+6T>C
IVS4+4A>T /1278insTATC	854A>C /1278insTATC
IVS4+4A>T / 2507+6T>C /1278insTATC	854A>C / 2507+6T>C /1278insTATC
854A>C / IVS4+4A>T /1278insTATC	854A>C / 2507+6T>C / R696P

Figur 1



Metodens begränsningar

1. Resultat som erhålls från detta eller annat diagnostiskt test ska användas och tolkas tillsammans med den totala kliniska bilden. Tepnel Diagnostics ansvarar inte för kliniska beslut.
2. Frånvaron av de mutationer som påvisas med detta kit är ingen garanti för att andra mutationer i gener vid Tay-Sachs, Canavans sjukdom, familjär dysautonomi och fanconianemi inte förekommer. Andra mutationer är möjliga och påvisas inte av detta kit.

Användaren av dessa tester ska betona dessa synpunkter vid rapportering av resultat till klinikern som ställer diagnos eller till den genetiska rådgivaren.

Referenser

1. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
2. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).