

Reagent kit PraxisTM Extended RAS Panel for qualitative determination of the status of specific mutations genes of RAS (KRAS (exons 2, 3, and 4) and NRAS (exons 2, 3, and 4) by sequencing a new generation in a human genomic DNA sample isolated from colorectal cancer tissue samples fixed in formalin and enclosed in paraffin blocks

Reference guide

Manufacturer:

Illumina, Inc

Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA

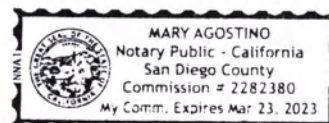
Approved

On behalf of Illumina, Inc.



Aurelia Brownridge
Sr. Regulatory Affairs Specialist
Illumina, Inc.

Date May 14, 2020



ACKNOWLEDGMENT

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California
County of San Diego)

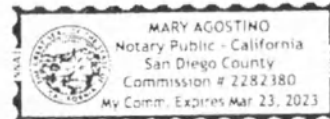
On May 14 2020 before me, Mary Agostino, Notary Public
(insert name and title of the officer)

personally appeared Anaelia Brownridge,
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are
subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in
his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the
person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing
paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Mary Agostino (Seal)



Praxis® Extended RAS Panel Reference Guide

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Introduction	3
Getting Started	6
Assay Workflow	15
Qualification of FFPE DNA Samples	16
Set Parameters	21
Hybridization of Oligonucleotide Pool	23
Removal of Unbound Oligonucleotides	26
Extension-Ligation of Bound Oligonucleotides	29
PCR Amplification	30
Verify Library Preparation	34
PCR Clean-Up	36
Library Normalization	39
Library Pooling	42
Library Sequencing	46
Technical Assistance	49



Document # 1000000037191 v00

August 2017

ILLUMINA PROPRIETARY

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

This document and its contents are proprietary to Illumina, Inc. and its affiliates ("Illumina"), and are intended solely for the contractual use of its customer in connection with the use of the product(s) described herein and for no other purpose. This document and its contents shall not be used or distributed for any other purpose and/or otherwise communicated, disclosed, or reproduced in any way whatsoever without the prior written consent of Illumina. Illumina does not convey any license under its patent, trademark, copyright, or common-law rights nor similar rights of any third parties by this document.

The instructions in this document must be strictly and explicitly followed by qualified and properly trained personnel in order to ensure the proper and safe use of the product(s) described herein. All of the contents of this document must be fully read and understood prior to using such product(s).

FAILURE TO COMPLETELY READ AND EXPLICITLY FOLLOW ALL OF THE INSTRUCTIONS CONTAINED HEREIN MAY RESULT IN DAMAGE TO THE PRODUCT(S), INJURY TO PERSONS, INCLUDING TO USERS OR OTHERS, AND DAMAGE TO OTHER PROPERTY.

ILLUMINA DOES NOT ASSUME ANY LIABILITY ARISING OUT OF THE IMPROPER USE OF THE PRODUCT(S) DESCRIBED HEREIN (INCLUDING PARTS THEREOF OR SOFTWARE).

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, Genetic Energy, MiSeqDx, Powered by Illumina, Praxis, TruSeq, and the streaming bases design are registered or pending trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

This product may be used as a component of human molecular diagnostic assays where applicable country laws allow. This product by itself does not provide any diagnostic result. This product includes GoTaq[®] Hot Start Polymerase manufactured by Promega Corporation for distribution by Illumina, Inc. Licensed to Promega Corporation under U.S. Patent Nos. 5,338,671 and 5,587,287 and their corresponding foreign patents.



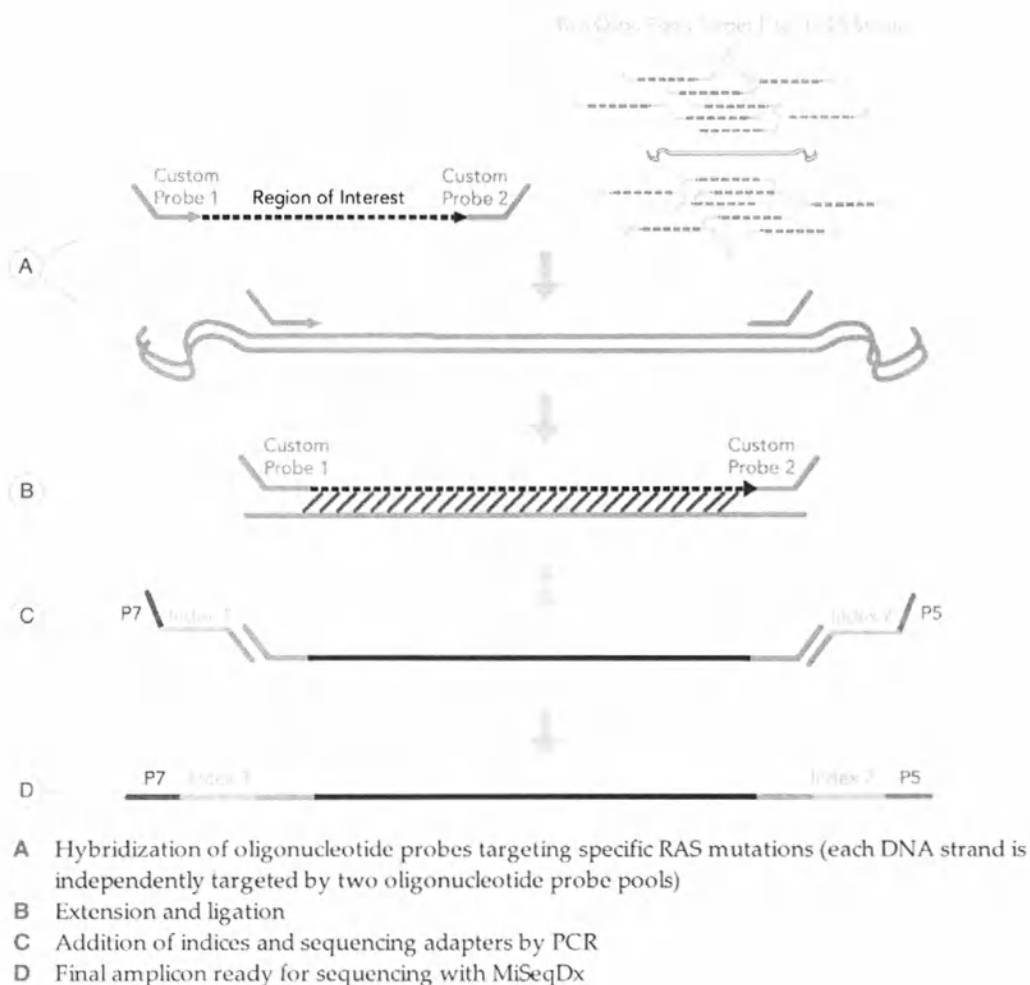
NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in the field of quality assurance and quality control for products and processes in the In Vitro Human Diagnostics Field, including, without limitation, conformance with specifications, purity and batch-to-batch consistency and including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

The Praxis™ Extended RAS Panel is a qualitative *in vitro* diagnostic test using targeted high throughput parallel sequencing for the detection of 56 specific mutations in RAS genes [KRAS (exons 2, 3, and 4) and NRAS (exons 2, 3, and 4)] in DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) colorectal cancer (CRC) tissue samples. The test is intended to be used on the Illumina MiSeqDx® instrument.

This reference guide provides more detailed instructions, technique tips, and helpful hints to newly trained users to help guide proper execution of the Praxis Extended RAS Panel protocol. This is intended as a supplement and is not meant to replace the package insert.

Pairs of oligonucleotides targeting specific mutations in RAS genes are hybridized to genomic DNA. Each genomic DNA sample is tested with two oligonucleotide pools that independently target each strand of DNA followed by extension and ligation to form DNA templates consisting of the regions of interest flanked by universal primer sequences. Using indexed primers supplied with the kit, DNA templates are then amplified by PCR, pooled into a single tube, and sequenced on the MiSeqDx instrument.



Process Overview

The Illumina Praxis Extended RAS Panel process can be summarized into the following steps:

Create a Run

First, create a run. The MiSeqDx uses the run information to identify each sample and its corresponding indexes.

To create a run, use the Local Run Manager and the Praxis Extended RAS Panel analysis module. Enter the sample name and indexes for the 96-well plate in the module. You can print out the plate layout from the module and use the information for setting up the plate during the assay workflow.

Prepare Libraries

Prepare the libraries using the protocol detailed in this user guide.

Sequence Samples on the MiSeqDx

The Praxis Extended RAS Panel must be sequenced on a MiSeqDx instrument using a paired-end 141 cycle run with dual indexing. For instructions for performing a sequencing run on the MiSeqDx, see the *MiSeqDx Instrument Reference Guide* (document # 1000000021961).

Automated Sequencing and Data Analysis

The Praxis Extended RAS Panel analysis module processes the base calls generated by the MiSeqDx instrument. It is an on-instrument software, which is built in to the instrument's processes. The analysis module produces details indicating whether each sample contains any of the Praxis Extended RAS Panel mutations. For more information about this software, see the *Local Run Manager Software Reference Guide for MiSeqDx* (document # 1000000011880) and the *Local Run Manager Extended RAS Panel Analysis Module Guide* (document # 1000000011875).

Tracking Tools

Illumina provides the following tools for sample tracking and guidance in the lab:

- The **Lab Tracking Form** can be used to record information such as operator name, sample and index information, start and stop times, reagent lot numbers, and barcodes.
- The **Praxis Extended RAS Panel** analysis module is used to create a run. The analysis module provides a feature for recording parameters for the sample plate, such as sample name and dual indexes applicable to the run.

Getting Started

This section describes the Illumina Praxis Extended RAS Panel kit contents, consumables and equipment used, DNA input recommendations, and best practices to apply during the protocol.

Praxis Extended RAS Panel Kit Contents

The Illumina Praxis Extended RAS Panel Kit (Catalog # 20012431) contains the following components. Store the kit components at the specified temperature and in designated pre- and post-amplification areas.

Because the pre- and post-amp reagents are shipped together, it is important to unpack the reagents in the pre-amp lab area, and then move the post-amp reagents to the proper post-amp storage area.

Praxis Extended RAS Panel Box

Box 1A Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Hybridization Buffer	1 tube	4.32 ml	Buffered aqueous solution containing salts and formamide	-25°C to -15°C
Extension-Ligation Mix	1 tube	4.8 ml	Buffered aqueous solution containing proprietary blend of DNA polymerases, DNA ligase, and dNTPs	-25°C to -15°C
Index Primers A-H (A501-A508)	1 tube per primer	192 µl	PCR primers with index sequences and sequencing adapters	-25°C to -15°C
Index Primers 1-12 (A701-A712)	1 tube per primer	128 µl	PCR primers with index sequences and sequencing adapters	-25°C to -15°C
PCR Polymerase	1 tube	56 µl	Proprietary DNA polymerase	-25°C to -15°C
PCR Master Mix	1 tube	2.8 ml	Buffered aqueous solution containing salts and dNTPs	-25°C to -15°C

Box 1B Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Library Normalization Diluent	1 tube	4.6 ml	Buffered aqueous solution containing salts, 2-Mercaptoethanol, and formamide	-25°C to -15°C
Library Dilution Buffer	2 tubes	4.5 ml	Buffered aqueous solution	-25°C to -15°C
PhiX Internal Control	1 tube	10 µl	Buffered aqueous solution containing PhiX genomic DNA	-25°C to -15°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 2

Table 3 Box 2 Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Contents	Storage
MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3	2 cartridges	Single-use cartridge that contains cluster generation and sequencing reagents for use with the MiSeqDx, including formamide, 2-Mercaptoethanol, and < 2% DMSO	-25°C to -15°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 3

Table 4 Box 3A Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Stringent Wash Buffer	1 bottle	24 ml	Buffered aqueous solution containing salts, 2-Mercaptoethanol and formamide	2°C to 8°C
Universal Wash Buffer	1 tube	4.8 ml	Buffered aqueous solution containing salts	2°C to 8°C

Table 5 Box 3B Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
PCR Clean-Up Beads	1 tube	5 ml	Buffered aqueous solution containing solid phase paramagnetic beads and polyethylene glycol	2°C to 8°C
Library Normalization Wash	2 tubes	4.8 ml	Buffered aqueous solution containing salts, 2-Mercaptoethanol and formamide	2°C to 8°C
Library Beads	1 tube	1.2 ml	Buffered aqueous solution containing solid phase paramagnetic beads	2°C to 8°C
MiSeq™ Dx Flow Cell	2 containers	1 flow cell	Glass substrate with covalently bound oligonucleotides	2°C to 8°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 4

Table 6 Box 4 Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)	2 bottles	500 ml	Buffered aqueous solution	2°C to 8°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 5

Table 7 Box 5 Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate	2 plates	N/A	Polypropylene microtiter plate with a modified polyethersulfone membrane	15°C to 30°C

Table 8 Box 5 Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Elution Buffer	1 tube	4.8 ml	Buffered aqueous solution	15°C to 30°C
Library Storage Buffer	1 tube	3.5 ml	Buffered aqueous solution	15°C to 30°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 6

Box 6 Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Oligo Pool A–Extended RAS	1 tube	150 µl	Buffered aqueous solution containing oligonucleotides targeting the RAS genes	-25°C to -15°C
Oligo Pool B–Extended RAS	1 tube	150 µl	Buffered aqueous solution containing oligonucleotides targeting the RAS genes	-25°C to -15°C
Quality Control (QC) Primers	4 tubes	75 µl	Buffered aqueous solution containing oligonucleotides for DNA sample qualification	-25°C to -15°C
Quality Control (QC) Template	1 tube	220 µl	Buffered aqueous solution containing genomic DNA for sample qualification	-25°C to -15°C
qPCR Master Mix	2 tubes	1 ml	Buffered aqueous solution containing qPCR reaction components	-25°C to -15°C
Panel Control–Extended RAS	1 tube	8 µl	Buffered aqueous solution containing genomic DNA for assay positive control	-25°C to -15°C

- 10 N NaOH (prepare from tablets or use a standard solution)
- TE Buffer
- RNase/DNase-free water

Post-Amp Reagents

- 10 N NaOH (prepare from tablets or use a standard solution)
- Ethanol, 200 proof for molecular biology
- TE Buffer
- RNase/DNase-free water

Equipment and Materials

Equipment and Materials Required Subsequent to

- 1 **MiSeqDx Instrument**, Catalog # DX-410-1001
- 2 **TruSeq® Index Plate Fixture Kit**, Catalog # FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, Catalog # FC-130-1007

Pre-Amp Equipment and Materials

- 1 **DNA Extraction and Purification Reagents**—See the package insert for more information about DNA Extraction.
- 2 **Heat Block**—One heat block for a 96-well PCR plate is required. The heat block must meet the following performance specifications. Heat blocks with heated lids are required for use.
 - ✦ Temperature Range: Ambient +5°C to 99°C
 - ✦ Temperature Regulation: ±0.1°C at 37°C; ±0.4°C at 60°C
- 3 **Sample Incubator**—One incubator (hybridization oven) is required. The incubator must meet the following performance specifications.
 - ✦ Temperature Range: 10°C to 100°C
 - ✦ Temperature Regulation: ±0.2°C
- 4 **Tabletop Centrifuge**—One tabletop centrifuge is required. (A separate centrifuge is required in the post-amp area.) Any plate centrifuge that attains the designated speeds of the protocol (280 to 2400 × g) is acceptable.
- 5 **Microcentrifuge**—One microcentrifuge for microcentrifuge tubes.
- 6 **Precision Pipettes**—One set of precision pipettes is required. (A separate set is required in the post-amp area.) The use of precision pipettes is required to ensure accurate reagent and sample delivery. If they are calibrated regularly and are accurate within 5% of stated volume, single-channel or multi-channel pipettes can be used.
- 7 **Sealing Rollers or Sealing Wedge**—A sealing roller or sealing wedge are required for sealing microplates.
- 8 **Consumables**—The following consumables are required.
 - ✦ 96-well or 384-well optical PCR plates and seals
 - ✦ 96-well skirted PCR plates, 0.2 ml, polypropylene, or equivalent
 - ✦ 96-well storage plates, 0.8 ml (MIDI plates)



NOTE

Make sure that the 96-well plate is fit compatible with the magnetic stand.



- ✦ PCR eight-tube strips
- ✦ Solution basin, PVC, RNase/DNase-free (trough)
- ✦ Thermal microplate sealer



NOTE

If a thermal microplate sealer is not available, adhesive aluminum foil seal can be used.

- Adhesive aluminum foil seal
- Appropriate PCR plate seals
- Aerosol resistant pipette tips

Post-Amp Equipment and Materials

- 1 **96-Well or 384-Well Real-Time PCR Detection System**—One Real-Time PCR Detection system is required. The system must meet the following performance specifications. In addition, the system must have a heated lid and support a 96-well or 384-well format.
 - Minimum Temperature Range: 37°C to 95°C
 - Accuracy/Uniformity: $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$
 - Dye: FAM
 - 2 **Thermal Cycler**—One thermal cycler is required. The thermal cycler must have a heated lid and meet the following performance specifications:
 - Minimum Temperature Control Range: 4°C to 99°C
 - Control Accuracy: $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$
 - 3 **Optical Compression Pad**—An optical compression pad is recommended to provide a proper thermal seal between the PCR thermal cycler and reaction plates when using adhesive plate seals.
 - 4 **Microplate Shaker**—One microplate shaker is required in the post-amp lab area. The plate shaker must meet the following performance specifications:
 - Maximum Mixing Speed: 3000 rpm
 - Mixing Speed Range: 200 to 3000 rpm
 - 5 **Tabletop Centrifuge**—One tabletop centrifuge is required. (A separate centrifuge is required in the pre-amp area.) Any plate centrifuge that attains the designated speeds of the protocol (280 to $2400 \times g$) is acceptable.
 - 6 **Heat Block**—One heat block for tubes is required. The heat block must meet the following performance specifications.
 - Temperature Range: Ambient $+5^{\circ}\text{C}$ to 99°C
 - Temperature Regulation: $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ at 37°C ; $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ at 60°C
 - 7 **Magnetic Stand**—One magnetic stand for a 96-well plate is required. Better performance is seen when the magnets are on the side of the stand and not on the bottom.
 - 8 **Precision Pipettes**—One set of precision pipettes is required. (A separate set is required in the pre-amp area.) The use of precision pipettes is required to ensure accurate reagent and sample delivery. If they are calibrated regularly and are accurate within 5% of stated volume, single-channel or multi-channel pipettes can be used.
 - 9 **Gel Electrophoresis Supplies**—Gel electrophoresis supplies and apparatus are required along with an appropriate staining method to visualize PCR products in the gel.
 - 10 **Consumables**—The following consumables are required.
 - 96-well skirted PCR plates, 0.2 ml, polypropylene, or equivalent
 - 96-well storage plates, 0.8 ml (MIDI plates)
-  **NOTE**
Make sure that the 96-well plate is fit compatible with the magnetic stand.
- 2-4% TBE Agarose gel

- ▶ 100 bp DNA molecular weight marker
- ▶ DNA loading dye
- ▶ Conical tubes, 15 ml
- ▶ Microcentrifuge tubes
- ▶ PCR eight-tube strips
- ▶ Solution basins, PVC, RNase/DNase-free (trough)
- ▶ Adhesive plate seals
- ▶ Aerosol resistant pipette tips

The PCR process is commonly used in the laboratory to amplify specific DNA sequences. Unless proper laboratory hygiene is used, PCR products can contaminate reagents, instrumentation, and genomic DNA samples, causing inaccurate and unreliable results. PCR product contamination can shut down lab processes and significantly delay normal operations.

Make sure that the lab is set up appropriately to reduce the risk of PCR product contamination:

▶ **Physically Separate Pre- and Post-Amp Areas**

- ▶ Physically separate laboratory space where pre-amp processes are performed (DNA extraction, quantification, and normalization) from the laboratory space where post-amp processes are performed.
- ▶ Never use the same sink to wash pre-amp and post-amp troughs.
- ▶ Never share the same water purification system for pre-amp and post-amp processes.
- ▶ Store all supplies used in the protocols in the pre-amp area, and transfer to the post-amp area as needed.

▶ **Use Dedicated Equipment and Supplies**

- ▶ Dedicate separate full sets of equipment and supplies (pipettes, centrifuges, oven, heat block, etc.) to pre-amp and post-amp lab processes, and never share between processes.
- ▶ Dedicate separate storage areas (freezers and refrigerators) to pre-amp and post-amp consumables.

Because the pre- and post-amplification reagents are shipped together, it is important to unpack the reagents in the pre-amp lab area, and then move the post-amp reagents to the proper post-amp storage area.

To prevent PCR product contamination, it is important to establish lab procedures and follow best practices. Illumina recommends daily and weekly cleaning of lab areas using 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach).



CAUTION

To prevent sample or reagent degradation, make sure that all vapors from the cleaning solution have fully dissipated before beginning any processes.

Daily Cleaning of Pre-Amp Area

A daily cleaning of the pre-amp area using a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution helps to eliminate PCR product that has entered the pre-amp area.

Identify pre-amp areas that pose the highest risk of contamination, and clean these areas with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution before beginning any pre-amp processes. High-risk areas might include, but are not limited to, the following items:

- ▶ Bench tops
- ▶ Door handles
- ▶ Refrigerator/freezer door handles
- ▶ Computer mouse
- ▶ Keyboards

Daily Cleaning of Post-Amp Area

Reducing the amount of PCR product in the post-amp area helps reduce the risk of contamination in the pre-amp area. Daily cleaning of the post-amp area using a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution helps achieve this.

Identify post-amp areas that pose the highest risk of contamination, and clean these areas with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution daily. High-risk areas might include, but are not limited to, the following items:

- ▶ Thermal cyclers
- ▶ Bench space used to process amplified DNA
- ▶ Door handles
- ▶ Refrigerator/freezer door handles
- ▶ Computer mouse
- ▶ Keyboards

Weekly Cleaning of All Lab Areas

- ▶ Once a week, perform a thorough cleaning of the pre-amp and post-amp areas using 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach).
- ▶ Clean all bench tops and laboratory surfaces.
- ▶ Clean all instruments that are not cleaned daily.
- ▶ Thoroughly mop lab floors.
- ▶ Make sure that personnel responsible for weekly cleaning are properly trained on prevention of PCR product contamination.

Items Fallen to the Floor

The floor is contaminated with PCR product transferred on the shoes of individuals coming from the post-amp area; therefore, anything falling to the floor must be treated as contaminated.

- ▶ Disposable items that have fallen to the floor, such as empty tubes, pipette tips, gloves, lab coat hangers, must be discarded.
- ▶ Non-disposable items that have fallen to the floor, such as a pipette or an important sample container, must be immediately and thoroughly cleaned with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution to remove PCR product contamination.
- ▶ Clean any lab surface that has come in contact with the contaminated item. Individuals handling anything that has fallen to the floor, disposable or non-disposable, must discard their lab gloves and put on a new pair.

Adhere to the following recommendations when preparing libraries for sequencing using this protocol.

Ensuring Consistency

- ▶ **Use multi-channel pipettes**—To ensure consistency across samples, use a multi-channel pipette where possible. Calibrate pipettes regularly.
- ▶ **Consistency for smaller sample preparations**—Each reagent tube supplied with the kit contains sufficient volume to generate results using manual pipettes and reagent troughs following standard laboratory techniques. To ensure accurate reagent volume delivery, single pipette reagent into each well or multi-channel pipette from reagents aliquoted into a PCR 8-tube strip.

Handling Magnetic Beads

- ▶ **Use at room temperature**—Allow the beads to reach room temperature prior to use.
- ▶ **Vortex until well-suspended**—Immediately prior to use, vortex the beads until they are well-suspended and the color appears homogeneous.
- ▶ **Mix samples thoroughly**—After adding the beads to the samples, mix thoroughly by pipetting up and down ten times. Illumina also recommends using a shaker to thoroughly mix samples.
- ▶ **Allow maximum binding**—For best results, incubate the bead/sample mixtures at room temperature for the entire duration indicated in the protocol.
- ▶ **Slowly aspirate cleared solution**—After placing the plate on the magnetic stand, wait for the solution to clear before proceeding. Keep the plate on the magnetic stand when slowly aspirating cleared solution, taking care not to disturb the separated beads.

Avoiding Cross-Contamination

- ▶ **Change tips between dispensing reagents and samples**—Always use fresh pipette tips between dispensing reagents and samples.
- ▶ **Mix plates as directed**—Mix samples with a multi-channel pipette and centrifuge the plate when indicated. Do not vortex the plates.
- ▶ **Use aerosol-resistant tips**—Using aerosol-resistant pipette tips reduces the risk of amplicon carry-over and sample-to-sample cross-contamination.

Washing with 80% Ethanol During the PCR Clean-Up Step

- ▶ **Prepare fresh 80% ethanol**—Always prepare fresh 80% ethanol for wash steps. Ethanol can absorb water from the air and impact results.
- ▶ **Remove all ethanol from wells**—Make sure that all ethanol is removed from the bottom of the wells, as it may contain residual contaminants. Use a P20 multi-channel pipette to remove residual ethanol and accelerate drying.
- ▶ **Allow complete evaporation**—Allow at least five minutes of drying time off the magnetic stand at room temperature for complete evaporation. Residual ethanol can impact the performance of subsequent reactions.

DNA Input Requirements

- ▶ **The Illumina Praxis Extended RAS Panel is designed to be used with genomic DNA** extracted from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) colorectal cancer (CRC) tissue samples.
- ▶ **Assessing DNA Quality**—The Praxis Extended RAS Panel workflow starts with a FFPE DNA qualification step to determine if the DNA is of sufficient quality for use with the

Praxis Extended RAS Panel, by measuring the amplifiable amounts of DNA in the sample relative to a control template. The qualification test determines a difference in quantification cycle (delta Cq value) for each sample relative to the control template.

Genomic DNA (gDNA) samples giving a delta Cq value less than or equal to 5.00 can be used for the Praxis Extended RAS Panel. Illumina does not support the use of gDNA samples giving a delta Cq value of greater than 5.00 with the Praxis Extended RAS Panel.

Quality Controls

Good laboratory practices mandate that the Panel Control sample and a negative (no-template) control sample be included in every run.

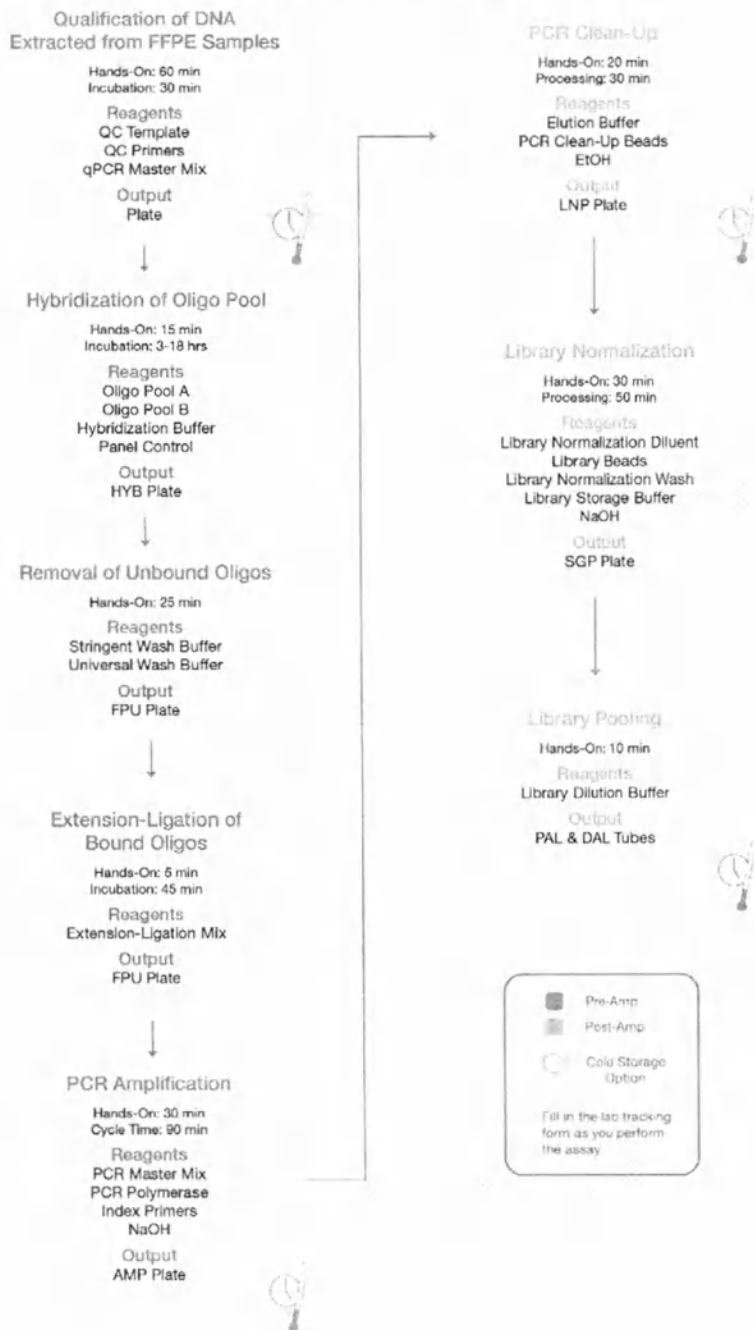
Illumina Praxis Extended RAS Panel Acronyms

Acronym	Definition
AMP	AMplification Plate
CLP	CLean-up Plate
DAI	Diluted Amplicon Library
FPU	Filter Plate Unit
HYB	HYBridization Plate
LNP	Library Normalization Plate
NTC	Negative/No Template Control
PAL	Pooled Amplicon Library
SCP	StoraGe Plate

Assay Workflow

The following diagram illustrates the Illumina Praxis Extended RAS Panel workflow. Safe stopping points are marked between steps.

Illumina Praxis Extended RAS Panel Workflow



Qualification of FFPE DNA Samples

During this step, a qPCR reaction will be performed to determine the amplifiability of your FFPE-extracted gDNA samples. By comparing the amplifiability of FFPE DNA relative to that of the Quality Control Template non-FFPE reference gDNA, a ΔC_q value can be calculated for each sample and used to predict its performance in the Praxis Extended RAS Panel assay. The exact amount of FFPE DNA input will vary according to the quality of the extracted DNA.

Estimated Time

- ▶ Total duration: 3 hours
- ▶ Hands-on: 60 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
QC Primers	4 tubes	-25°C to -15°C	Illumina	6
QC Template	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	6
qPCR Master Mix	2 tubes	-25°C to -15°C	Illumina	6
Genomic DNA	As needed	-25°C to -15°C	User	—
RNase/DNase-free Water	As needed	15°C to 30°C	User	—
96 or 384-well Optical PCR Plate and Seal	1 plate	15°C to 30°C	User	—
PCR Eight-tube Strips	As needed	15°C to 30°C	User	—
Microcentrifuge Tubes	As needed	15°C to 30°C	User	—

- 1 Remove the QC Template, QC Primers, qPCR Master Mix, and genomic DNA from -25°C to -15°C storage and thaw at room temperature for up to 30 minutes.
- 2 Place thawed tubes on ice.



NOTE

If using QC Template for the first time, aliquot 7 µl of QC Template into different PCR strip tubes for long-term storage to avoid freeze-thawing.

Procedure

- 1 Determine the plate layout of the qPCR reaction.
For 10 samples, Illumina recommends the layout in Figure 2 for a 384-well format. A similar layout can be adapted for a 96-well format. Test QC Template, NTC, and each sample in triplicate.

Suggested qPCR Plate Layout for 10 Samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C		Sample 1	Sample 1	Sample 1		Sample 7	Sample 7	Sample 7																
D																								
E		Sample 2	Sample 2	Sample 2		Sample 8	Sample 8	Sample 8																
F																								
G		Sample 3	Sample 3	Sample 3		Sample 9	Sample 9	Sample 9																
H																								
I		Sample 4	Sample 4	Sample 4		Sample 10	Sample 10	Sample 10																
J																								
K		Sample 5	Sample 5	Sample 5		QCT	QCT	QCT																
L																								
M		Sample 6	Sample 6	Sample 6		NTC	NTC	NTC																
N																								
O																								
P																								

QCT = QC Template

NTC = No Template Control

- Add 5 µl of QC Template to 495 µl of RNase/DNase-free water in a microcentrifuge tube.
- Vortex the dilution to mix the sample.
- Add 1.5 µl of extracted genomic DNA to 148.5 µl of RNase/DNase-free water in a PCR eight-tube strip to make a 100-fold dilution.

**NOTE**

Illumina recommends performing sample dilutions in a PCR eight-tube strip to facilitate multi-channel pipetting.

- Using a P200, pipette up and down 10 times to mix the dilutions.
- Add 150 µl of the diluted QC Template to an unused well in the PCR eight-tube strip consistent with the plate layout.
- To another unused well, add 150 µl of nuclease-free water for use as NTC sample.
- Prepare the qPCR Master Mix reaction per Table 11 (384-well format) or Table 12 (96-well format). The master mix contains extra volume.

Table 11 qPCR Master Mix Reactions (384-well Format)

Consumable	µl per Well	µl for 36 Reactions
qPCR Master Mix	5.0 µl	205 µl
QC Primers	0.8 µl	33 µl
RNase/DNase-free Water	2.2 µl	90 µl

qPCR Master Mix Reactions (96-well Format)

Consumable	μl per Well	μl for 36 Reactions
qPCR Master Mix	10.0 μl	410 μl
QC Primers	1.6 μl	66 μl
RNase/DNase-free Water	4.4 μl	180 μl

- 9 Mix reaction mix gently but thoroughly.
- 10 Place the reaction mix on ice and protect it from light until use.
- 11 Aliquot master mix into a trough or eight-tube strip to aid in dispensing with multi-channel pipettor.
- 12 Add 8 μl (384-well format) or 16 μl (96-well format) of the master mix to each well of the qPCR plate. Take care to pipette accurately into the wells as small variations will affect the assay.
- 13 Add 2 μl (384-well format) or 4 μl (96-well format) of the QC Template dilution, the sample dilutions, or nuclease-free water to each well of the plate. Take care to pipette accurately into the wells as small variations will affect the assay.
- 14 Seal the plate with the appropriate seal for your instrument, taking care to avoid cross-contamination and to avoid smudging the surface of the lids. Verify that the seal is oriented correctly and uniformly sealed.
- 15 Place the plate on an adapter (if needed) and centrifuge the plate to 1000 × g for 1 minute.
- 16 Ensure that the seal is free of any liquid or dust, place the plate on the qPCR machine in the correct orientation, then close the lid and run the following qPCR thermal profile:
 - ▶ Hot Start
 - ▶ 50°C for 2 minutes
 - ▶ 95°C for 10 minutes
 - ▶ x40
 - ▶ 95°C for 30 seconds
 - ▶ 57°C for 30 seconds
 - ▶ 72°C for 30 seconds
 - ▶ Confirm that the instrument captures images after the 72°C step.

**NOTE**

The C_q threshold should be set to a value appropriate for your instrument that avoids inaccurate measurements due to background.

- 17 After the final step, the thermal cycler analyzes the samples. Ensure that the QC Template produces expected amplification curves (see green amplification curves in Figure 3). On most systems, the QC Template should amplify at a C_q of approximately 15–22 cycles. Exclude replicates from a triplicate group that are > 0.5 C_q different from the rest of the group. At least two of the three replicates less than or equal to 0.5 C_q apart must be included in the final calculation. If these criteria are not met, the qualification process should be repeated for those samples.

**NOTE**

Four or more samples per 10-sample run having replicates removed indicate technical errors and the qualification process for all samples should be repeated.

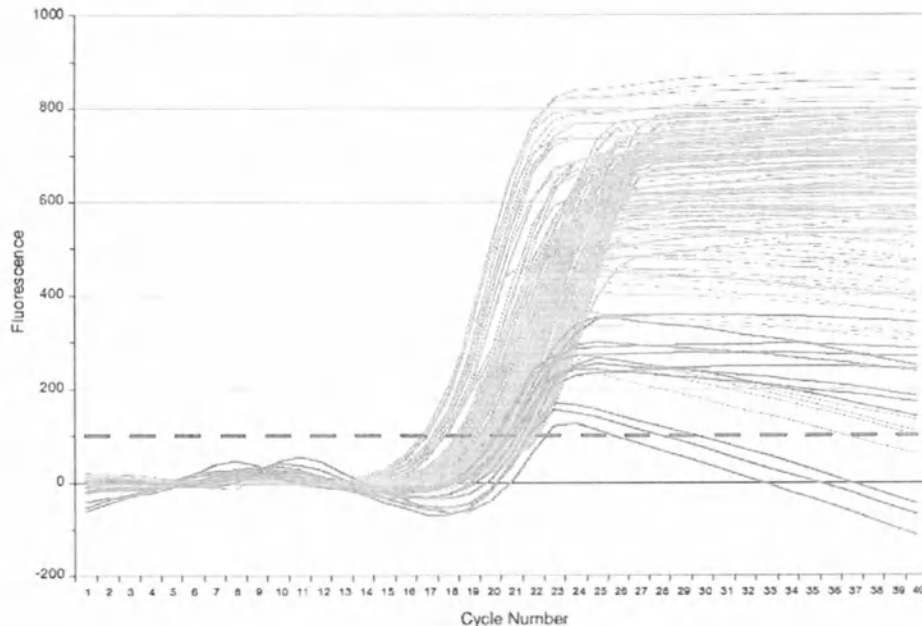

NOTE

If little to no measurable amplification occurs for two or more replicates, the qualification process should be repeated for those samples.

- 18 Replicates exhibiting abnormal amplification curves should be excluded (see blue amplification curves in Figure 3).



Qualification of Samples* by qPCR



* DNA samples shown in Figure 3 were qualified for use in creating libraries for next-generation sequencing using real-time PCR following parameters stated in the text. The graph shows qPCR amplification curves generated by these samples.

Purple Line—Cq Threshold

Blue Curves—DNA replicates with abnormal amplification profiles that should be excluded from dCq calculations

Green Curves—DNA replicates with expected amplification curves that can be used for delta Cq calculations

- 19 Subtract the average Cq for the QC Template from the average Cq for each sample (Sample Average Cq – QC Template Average Cq) to yield the delta Cq values for each sample. Record the delta Cq values and the sample dilution factors. The sample dilution factors are based on the recommendations in Table 16.
- 20 Make sure that amplification of the NTC occurs at least 10 cycles after QC Template amplification.


NOTE

Repeat entire qualification process for all samples if NTC fails.

dCq Calculation Examples

Example #	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Final values included in Cq calculations	Average Cq	dCq*
1	24.80	25.11	25.06	All	24.99	6.87
Actions:	Does not meet dCq requirement (≤ 5.00). Sample does not qualify for the assay.					
2	17.22	18.58	17.91	None	N/A	N/A
Actions:	Remove replicates >0.5 Cq different from the rest of triplicates (all three). Sample qualification process must be repeated as a minimum of two valid replicates are required.					
3	22.45	22.63	23.52	22.45 & 22.63	22.54	4.42
Actions:	Remove replicate which is >0.5 Cq different from the rest of triplicates. Calculate dCq using two valid replicate values. dCq requirement is met (≤ 5.00).					
4	21.56	21.73	21.48	All	21.59	3.46
Actions:	Sample passed with three replicate values that are not >0.5 Cq apart. dCq requirement is met (≤ 5.00).					
5	18.21	18.50	19.04	All	18.70	0.58
Actions:	Sample passed with three replicate values that are not >0.5 Cq apart. dCq requirement is met (≤ 5.00).					
QC Template (Example 1)	17.86	18.11	18.40	All	18.12	0
Actions:	QC Template passes with three valid replicate values that are not >0.5 Cq apart. QC Template passes QC (average Cq ≥ 15 and ≤ 22).					
	Control considerations					
NTC (negative control)	26.00	25.64	25.83	All	25.82	7.7
Actions:	Entire sample qualification fails. Amplification of the NTC must occur ≥ 10 cycles after QC Template amplification. Repeat qualification process for all samples, QC Template, and NTC.					
QC Template (Example 2)	9.85	9.73	9.87	All	9.82	0
Actions:	QC Template fails. QC Template average Cq must be ≥ 15 and ≤ 22 . Repeat sample qualification process for all samples, QC Template, and NTC.					

*dCq is calculated by [sample Average Cq - QC Template (Example 1) Average Cq]

SAFE STOPPING POINT

Illumina recommends storing extracted genomic DNA between 2°C to 8°C for a maximum of 28 days or storing frozen between -15°C to -25°C for a maximum of 161 days. Genomic DNA stored frozen is stable for a maximum of 2 freeze/thaw cycles.

Set Parameters

- 1 Log in to Local Run Manager.
- 2 Click **Create Run**, and select **Extended RAS**.
- 3 Make sure that "Create Run Praxis Extended RAS" is visible in the top left corner of the screen.
- 4 Enter a run name that identifies the run from sequencing through analysis.
Use alphanumeric characters, spaces, underscores, or dashes.
- 5 [Optional] Enter a run description to help identify the run.
Use alphanumeric characters.

Specify Samples for the Run

Specify samples for the run using the following options:

- ▶ **Enter samples manually**—Use the table on the Create Run screen.
- ▶ **Import samples**—Navigate to an external file in a comma-separated values (*.csv) format.

After you have populated the samples table, you can export the sample information to an external file, and import the file for another run.

Enter Samples Manually

- 1 Click the plate region A1 or E7 to enter sample information in the samples table.
Region A1 is equivalent to the upper left quadrant of wells in the Hyb plate layout, and includes samples for Oligo Pools A and B.
Region E7 is equivalent to the lower right quadrant of wells in the Hyb plate layout, and includes samples for Oligo Pools A and B.
- 2 In the Pool A table, enter a unique sample name in the Sample Name field for each well you use.
Use alphanumeric characters, dashes, or underscores.
The sample name automatically populates the corresponding well in the Pool B table.
Dual index adapters for each Index Read, specific to the well, display as you enter a sample name.
- 3 [Optional] Although the default layout is recommended, to change the position of control samples, use the Positive Control or Negative Control drop down menu.
- 4 Click the print  icon to display the plate layout.
- 5 Select **Print** to print the plate layout as a reference for preparing libraries.
- 6 Click **Close**.
- 7 Click **Save Run**.

Import Samples

- 1 Click the plate region A1 or E7.
- 2 Click the **Export**  icon for an example template.

- 3 Enter a unique sample name in the template for up to 10 samples and save the file. Use alphanumeric characters, dashes, or underscores.

[Data] Sample Names as a 4 * 3 matrix		
Sample1	Sample5	Sample9
Sample2	Sample6	Sample10
Sample3	Sample7	Positive_Control
Sample4	Sample8	Negative_Control

- 4 Click **Import Samples**.
- 5 Browse to the location of the sample information file in *.csv file format.
- 6 When finished, click the print  icon to display the plate layout.
- 7 Select **Print** to print the plate layout as a reference for preparing libraries.
- 8 Click **Close**.
- 9 Click **Save Run**.

Index Primer Sequences

Sequences for Index Primers A-H (A501-A508)

Index Primer	Sequence
Index Primer A (A501)	TGAACCTT
Index Primer B (A502)	TGCTAAGT
Index Primer C (A503)	TGTTCTCT
Index Primer D (A504)	TAAGACAC
Index Primer E (A505)	CTAATCGA
Index Primer F (A506)	CTAGAACA
Index Primer G (A507)	TAAGTTC
Index Primer H (A508)	TAGACCTA

Sequences for Index Primers 1-12 (A701-A712)

Index Primer	Sequence
Index Primer 1 (A701)	ATCACGAC
Index Primer 2 (A702)	ACAGTGGT
Index Primer 3 (A703)	CAGATCCA
Index Primer 4 (A704)	ACAAACGG
Index Primer 5 (A705)	ACCCAGCA
Index Primer 6 (A706)	AACCCCTC
Index Primer 7 (A707)	CCCAACCT
Index Primer 8 (A708)	CACCACAC
Index Primer 9 (A709)	GAAACCCA
Index Primer 10 (A710)	TGTGACCA
Index Primer 11 (A711)	AGGGTCAA
Index Primer 12 (A712)	AGGAGTGG

Hybridization of Oligonucleotide Pools

During this step, the Extended RAS oligonucleotide pools containing upstream and downstream oligonucleotides specific to the RAS genes are hybridized to genomic DNA samples.



WARNING

This set of reagents contains potentially hazardous chemicals. Personal injury can occur through inhalation, ingestion, skin contact, and eye contact. Wear protective equipment, including eye protection, gloves, and laboratory coat appropriate for risk of exposure. Handle used reagents as chemical waste and discard in accordance with applicable regional, national, and local laws and regulations. For additional environmental, health, and safety information, see the SDS at support.illumina.com/sds.html.



NOTE

Illumina does not support the use of gDNA samples giving a delta Cq value of greater than 5.00.

Estimated Time

- ▶ Total duration: 3–18 hours (overnight)
- ▶ Hands-on: 15 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
Oligo Pool A - Extended RAS	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	6
Oligo Pool B - Extended RAS	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	6
Hybridization Buffer	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	1A
Genomic DNA	20 µl	-25°C to -15°C	User	—
Panel Control - Extended RAS	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	6
TE Buffer	As needed	15°C to 30°C	User	—
96-well skirted PCR plate	1 plate	15°C to 30°C	User	—
Thermal Microplate Sealer or Adhesive Aluminum Foil	2 seals	15°C to 30°C	User	—
Sterile Troughs	As needed	15°C to 30°C	User	—

Preparation

- 1 Determine genomic DNA samples to be used in the assay. Samples giving a delta Cq value less than or equal to 5.00 can be used for the Praxis Extended RAS Panel.
- 2 [Optional] If extracted DNA samples do not meet the delta Cq threshold, additional tissue sections can be used for DNA extraction if available.
- 3 Remove the Oligo Pool A, Oligo Pool B, Hybridization Buffer, genomic DNA samples, and Panel Control from -25°C to -15°C storage and thaw at room temperature.
- 4 Vortex the Oligo Pool A, Oligo Pool B, and Hybridization Buffer vigorously to make sure that all precipitates have dissolved, then briefly centrifuge the tubes to collect liquid.

**NOTE**

Before using Hybridization Buffer, hold the tube in front of a light and visually inspect to make sure that all precipitates have completely dissolved.

- 5 Set a 96-well heat block to 95°C.
- 6 Pre-heat an incubator to 37°C to prepare for the extension-ligation step.
- 7 Create the run and enter sample plate information in the Praxis Extended RAS Panel analysis module. Verify the location of positive and negative controls and then print sample plate layout. Illumina recommends processing samples in batches no larger than 12 samples/24 libraries.

**NOTE**

Use of controls enables Illumina Technical Support to provide effective troubleshooting assistance. Illumina Technical Support will not provide assistance unless these control reactions were included in the run.

- 1 Label a new 96-well PCR plate "HYB_Plate_ID".
See Figure 4 for the suggested HYB plate layout for the following steps.

HYB Plate Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 1	Sample 5	Sample 9						
B	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 2	Sample 6	Sample 10						
C	Sample 3	Sample 7	Positive Control	Sample 3	Sample 7	Positive Control						
D	Sample 4	Sample 8	Negative Control	Sample 4	Sample 8	Negative Control						
E							Sample 11	Sample 15	Sample 19	Sample 11	Sample 15	Sample 19
F							Sample 12	Sample 16	Sample 20	Sample 12	Sample 16	Sample 20
G							Sample 13	Sample 17	Positive Control	Sample 13	Sample 17	Positive Control
H							Sample 14	Sample 18	Negative Control	Sample 14	Sample 18	Negative Control

Extended RAS-Oligo Pool A

Extended RAS-Oligo Pool B

- 2 Using the plate layout in Figure 4, add 10 µl of TE Buffer to the wells indicated as Negative Control (No Template Control) for Oligo Pool A and Oligo Pool B.
- 3 For each 12 sample/ 24 library preparation, add 2.5 µl of Panel Control to 22.5 µl of TE Buffer in a microcentrifuge tube. Mix the diluted Panel Control thoroughly.
- 4 Using the plate layout in Figure 4, add 10 µl of diluted Panel Control prepared in the previous step to each of the two indicated Positive Control wells for Oligo Pool A and Oligo Pool B.
- 5 Determine if sample dilution is required based on Table 16. If dilution is necessary, take 15 µl of genomic DNA extracted from FFPE samples and dilute in TE buffer according to Table

16. For example, for a sample with delta C_q of -1.50, add 15 µl sample to 15 µl of TE Buffer. For a sample with delta C_q of -2.50, add 15 µl sample to 45 µl of TE Buffer.

Delta C_q Dilution Table

Delta C _q	< -1.51	-1.50 to -0.51	-0.50 to 0.50	0.51 to 1.50	1.51 to 5.00	> 5.00
Dilution	4x	2x	No dilution	No dilution	No dilution	Not supported

- 6 Using the plate layout in Figure 4, add 10 µl of each genomic DNA sample as prepared in step 5 to the Oligo Pool A wells of the **HYB** plate, starting with columns 1 or 7. Repeat this process for the Oligo Pool B wells of the **HYB** plate, starting with columns 4 or 10.



NOTE

Verify that DNA sample layout and the positions of positive and negative controls match the plate layout in Figure 4.

- 7 Using a multi-channel pipette, add 5 µl of Oligo Pool A to all wells containing genomic DNA, Panel Control, and Negative Control indicated for Oligo Pool A in columns 1-3 or 7-9 in the **HYB** plate. Then add 5 µl of Oligo Pool B to all wells containing genomic DNA, Panel Control, and Negative Control indicated for Oligo Pool B in columns 4-6 or 10-12 in the **HYB** plate. Change tips after each column to avoid cross-contamination.
- 8 Using a multi-channel pipette, add 40 µl of Hybridization Buffer to each sample in the **HYB** plate. Gently pipette up and down 3–5 times to mix. Change tips after each column to avoid cross-contamination.



NOTE

Ensure any crystals or precipitate in Hybridization Buffer have dissolved.



NOTE

Do not mix the Oligo Pools and Hybridization Buffer for storage. If combined, the Oligo Pools become unstable, even when stored frozen.

- 9 Seal the **HYB** plate with a thermal microplate sealer. If a thermal sealer is not available, use an adhesive aluminum foil seal and secure the seal with a sealing roller or wedge, especially on the perimeter of the plate.
- 10 Centrifuge at 1000 × g at room temperature for 1 minute.
- 11 Place the **HYB** plate in the pre-heated block at 95°C and incubate for 1 minute.
- 12 Change the temperature of the same heat block to 40°C and incubate for 3–18 hours.



NOTE

Moving the plate from the 95°C heat block to another pre-heated block set to 40°C will adversely affect hybridization.

Removal of Unbound Oligonucleotides

This process removes unbound oligonucleotides from genomic DNA using a filter capable of size selection. Two wash steps using Stringent Wash Buffer ensure complete removal of unbound oligonucleotides. A third wash step using Universal Wash Buffer removes residual Stringent Wash Buffer and prepares samples for the extension-ligation step.

WARNING

This set of reagents contains potentially hazardous chemicals. Personal injury can occur through inhalation, ingestion, skin contact, and eye contact. Wear protective equipment, including eye protection, gloves, and laboratory coat appropriate for risk of exposure. Handle used reagents as chemical waste and discard in accordance with applicable regional, national, and local laws and regulations. For additional environmental, health, and safety information, see the SDS at support.illumina.com/sds.html.

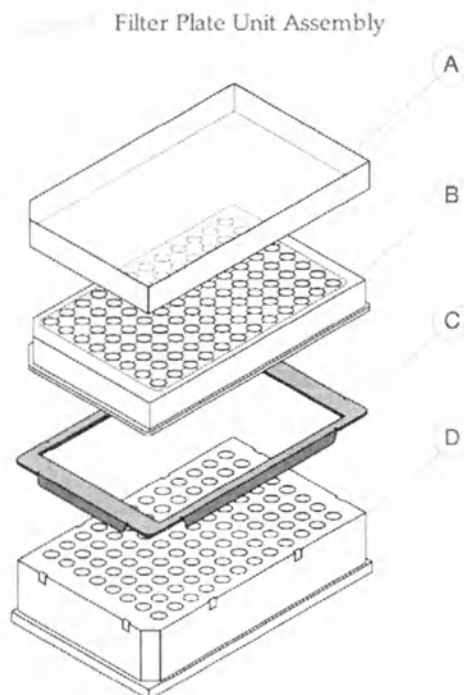
Estimated Time

- ▶ Total duration: 25 minutes
- ▶ Hands-on: 25 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
Extension-Ligation Mix	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	1A
Stringent Wash Buffer	1 bottle	2°C to 8°C	Illumina	3A
Universal Wash Buffer	1 tube	2°C to 8°C	Illumina	3A
TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate	1 plate	15°C to 30°C	Illumina	5
Adapter collar	1 plate	15°C to 30°C	User	—
MIDI plate	1 plate	15°C to 30°C	User	—
Troughs	As needed	15°C to 30°C	User	—

- 1 Remove Extension-Ligation Mix from -25°C to -15°C storage and thaw at room temperature.
- 2 Extension-Ligation Mix is used in the Extension-Ligation step and takes approximately 20 minutes to thaw.
- 3 Remove Stringent Wash Buffer and Universal Wash Buffer from 2°C to 8°C storage and set aside at room temperature.
- 4 Assemble the filter plate assembly unit (FPU) in the following order (from bottom to top):



- A Lid
- B Filter plate
- C Adapter collar
- D MIDI plate

- 5 Label the filter plate **FPU_Plate_ID**.
- 6 Pre-wash the filter plate membrane as follows:
 - a Using a multi-channel pipette, add 50 μ l of Stringent Wash Buffer to each well.
 - b Cover the **FPU** plate with the filter plate lid and keep it covered during each centrifugation step.
 - c Centrifuge the **FPU** at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.
 - d If the wash buffer does not drain completely, centrifuge the filter plate again at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.



NOTE

Illumina strongly recommends keeping spare filter plates (FC-130-1006) on hand as general lab supplies.

Procedure

- 1 After the hybridization incubation, confirm the heat block has cooled to 40°C.



NOTE
If the heat block fails to cool to 40°C overnight, library preparation will need to be repeated.
- 2 Remove the **HYB** plate from the heat block and centrifuge at $1000 \times g$ at room temperature for 1 minute to collect condensation.

- 3 Using a multi-channel pipette set to 65 μ l, transfer the entire volume of each sample onto the center of the corresponding pre-washed wells of the filter plate. Change tips after each column to avoid cross-contamination.

- 4 Cover the filter plate with the lid and centrifuge at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.



NOTE

Make sure that liquid has drained after centrifugation. Repeat centrifugation if necessary.

- 5 Wash the filter plate as follows:

- a Using a multi-channel pipette, add 50 μ l of Stringent Wash Buffer to each sample well. Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.
- b Cover the filter plate with the lid and centrifuge at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.
- c If the wash buffer does not drain completely, centrifuge the filter plate again at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.

- 6 Repeat the wash as follows:

- a Using a multi-channel pipette, add 50 μ l of Stringent Wash Buffer to each sample well. Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.
- a Cover the filter plate with the lid and centrifuge at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.
- b If the wash buffer does not drain completely, centrifuge the filter plate again at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.

- 7 Discard all the flow-through (containing formamide) collected up to this point in an appropriate hazardous waste container, then reassemble the FPU. The same MIDI plate can be re-used for the rest of the pre-amplification process.

- 8 Using a multi-channel pipette, add 45 μ l of Universal Wash Buffer to each sample well. Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.

- 9 Cover the filter plate with the lid and centrifuge at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.



NOTE

Make sure that all liquid has drained after centrifugation. Repeat centrifugation if necessary. Residual wash buffer may inhibit subsequent enzymatic reactions.

Extension-Ligation of Bound Oligonucleotides

This process connects the hybridized upstream and downstream oligonucleotides. A DNA polymerase extends from the upstream oligonucleotide through the targeted region, followed by ligation to the 5' end of the downstream oligonucleotide using a DNA ligase. This results in the formation of products containing the targeted regions of interest flanked by sequences required for amplification.

Estimated Time

- ▶ Total duration: 50 minutes
- ▶ Hands-on: 5 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
Extension-Ligation Mix	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	1A
Adhesive aluminum foil seal	1 seal	15°C to 30°C	User	—
Troughs	As needed	15°C to 30°C	User	—

- 1 Using a multi-channel pipette, add 45 µl of Extension-Ligation Mix to each sample well of the filter plate. The Extension-Ligation reaction takes place on the filter plate membrane. Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.
- 2 Seal the filter plate with adhesive aluminum foil, and then cover with the lid to secure the foil during incubation.
- 3 Incubate the entire FPU assembly in the pre-heated 37°C incubator for 45 minutes.
- 4 While the FPU plate is incubating, prepare the AMP (Amplification Plate) as described in the following section.

PCR Amplification

In this step, the extension-ligation products are amplified using primers that add index sequences for sample multiplexing, as well as common adapters required for cluster generation.

Estimated Time

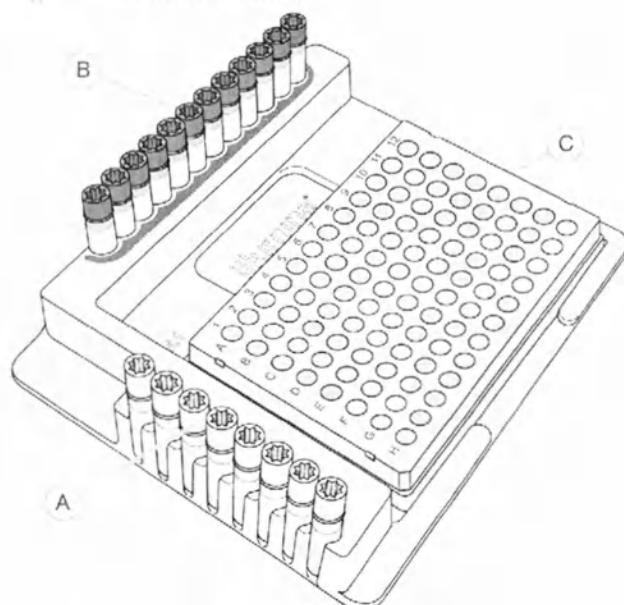
- ✦ Total duration: ~105 minutes
- ✦ Hands-on: 30 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
PCR Master Mix	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	1A
Index Primers A-H (A501-A508)	1 tube per primer	-25°C to -15°C	Illumina	1A
Index Primers 1-12 (A701-A712)	1 tube per primer	-25°C to -15°C	Illumina	1A
PCR Polymerase	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	1A
Appropriate PCR plate seal	1	15°C to 30°C	User	—
0.05 N NaOH, freshly prepared	5 mL	15°C to 30°C	User	—
96-well skirted PCR plate	1 plate	15°C to 30°C	User	—
Troughs	As needed	15°C to 30°C	User	—

- 1 Prepare fresh 0.05 N NaOH by adding 25 µl of 10 N NaOH to 4975 µl of sterile water.
- 2 Determine the index primers to be used according to the plate graphic printout from Praxis Extended RAS Panel analysis module.
- 3 Remove PCR Master Mix and the appropriate index primers from -25°C to -15°C storage and thaw on a bench at room temperature. Allow approximately 20 minutes to thaw the reagents.
- 4 After the index primers are completely thawed, vortex each tube to mix and briefly centrifuge the tubes in a microcentrifuge. Use 1.7 ml microcentrifuge tubes as adapters for the microcentrifuge.
- 5 Arrange the primers in a rack using the following arrangements:
 - a Arrange Index Primers A-H (A501-A508) primer tubes (white caps, clear solution) vertically, aligned with rows A through H.
 - b Arrange Index Primers 1-12 (A701-A712) primer tubes (orange caps, yellow solution) horizontally, aligned with columns 1 through 12.

Figure 6 Index Plate Fixture



- A Index Primers A-H (A501-A508) (white caps)
- B Index Primers 1-12 (A701-A712) (orange caps)
- C AMP plate

- 6 Label a new 96-well PCR plate "AMP" (Amplification Plate).
- 7 Add index primers to the AMP plate as follows:
 - a Using a multi-channel pipette, add 9 μ l of the selected index primers [A-H (A501-A508)] (clear solution) to the appropriate well in a column of the AMP plate.
 - b Using a multi-channel pipette, add 9 μ l of the selected index primers [1-12 (A701-A712)] (yellow solution) to the appropriate row of the AMP plate. *Tips must be changed after each row to avoid index cross-contamination.*
 - c Remove all the index primer tubes from the working area.



NOTE

Index primers are single use only and should be discarded immediately after use.

- 8 Prepare the PCR Master Mix/PCR Polymerase PCR working solution as follows:
 - a For 12 samples/24 libraries, add 21 μ l of PCR Polymerase to 1050 μ l of PCR Master Mix.
 - b Invert the prepared PCR working solution 20 times to mix.

You will add this working solution to the AMP plate in the next section. The PCR working solution is stable at room temperature for 10 minutes and can also be stored on ice if needed during preparation.



NOTE

Always add PCR Polymerase to PCR Master Mix just prior to use. Never store the combined PCR working solution.

Procedure

- 1 When the 45-minute extension-ligation reaction is complete, remove the **FPU** from the incubator. Remove the aluminum foil seal and replace with the filter plate lid. Removing the aluminum foil seal before centrifugation ensures the reaction supernatant will drain into the waste plate effectively.
 - 2 Centrifuge the **FPU** at $2400 \times g$ at room temperature for 2 minutes.
 - 3 Using a multi-channel pipette, add 25 μl of 0.05 N NaOH to each sample well on the filter plate. Ensuring that pipette tips come in contact with the membrane, pipette the NaOH up and down 5–6 times. Tips must be changed after each column.
 - 4 Cover and incubate the filter plate at room temperature for 5 minutes.
 - 5 While the filter plate is incubating, use a multi-channel pipette to transfer 22 μl of the PCR working solution to each well of the AMP plate containing index primers. Change tips between samples.
 - 6 Transfer samples eluted from the filter to the AMP plate as follows:
 - a Set a multi-channel P20 pipette to 20 μl .
 - b Pipette the samples in the first column of the filter plate up and down 5–6 times.
- 

NOTE
Slightly tilt the **FPU** plate to ensure complete aspiration and to avoid air bubbles.
- c Transfer 20 μl from the filter plate to the corresponding column of the **AMP** plate.
 - d Gently pipette up and down 5–6 times to thoroughly combine the DNA with the PCR working solution.
 - e Transfer the remaining columns from the filter plate to the AMP plate in a similar manner. *Tips must be changed after each column to avoid index and sample cross-contamination.*
 - f After all the samples have been transferred, the waste collection MIDI plate of the **FPU** can be discarded. The metal adapter collar should be cleaned and put away for future use.
- 7 Cover the **AMP** plate with the appropriate plate seal and secure with a rubber roller.
 - 8 Centrifuge at $1000 \times g$ at room temperature for 1 minute.
 - 9 Transfer the AMP plate to the post-amplification area.
 - 10 Perform PCR using the following program on a thermal cycler:
 - ▶ 95°C for 3 minutes
 - ▶ 32 cycles of:
 - ▶ 95°C for 30 seconds
 - ▶ 66°C for 30 seconds
 - ▶ 72°C for 60 seconds
 - ▶ 72°C for 5 minutes
 - ▶ Hold at 10°C



NOTE

Illumina strongly recommends using an Optical Compression Pad to provide a proper thermal seal between the PCR thermal cycler and reaction plates and prevent sample evaporation.



NOTE

On the PCR machine, set the reaction volume to 60 μ l and the temperature ramp speed to maximum.

SAFE STOPPING POINT

If not proceeding immediately to PCR Clean-Up, the AMP plate can remain on the thermal cycler overnight, or can be stored at 2°C to 8°C up to 48 hours.

Venty Library Preparation

After PCR:

- 1 Combine 5 μ l of amplified product with 15 μ l of RNase/DNase-free water and DNA loading dye if necessary.
- 2 Run on a 2-4% TBE agarose gel with 100 bp ladder to confirm the presence and brightness of the 250-280 bp library product.
 - Samples that show amplification in both Oligo Pool A and B are considered valid and can be processed through the remainder of the workflow (Figure 7).
 - Samples showing little to no amplification in one Oligo Pool (Figure 8, left) or both Oligo Pools (Figure 8, right) are considered invalid and should not be processed through the remainder of the workflow. If an invalid gel result is observed, library preparation for that sample or samples will need to be repeated.
 - The Negative Control sample should show an Invalid gel result. If the Negative Control sample shows amplification in both Oligo Pool A and B, this indicates potential processing errors, i.e. contamination, pipetting errors, or sample mix-ups. The operator should evaluate the root cause and repeat library preparation as appropriate. If contamination is suspected, library preparation for all samples should be repeated. If pipetting errors or mix-ups are suspected, repeat library preparation for the affected samples.
 - The presence of a 500 bp band is normal and does not affect assay performance.

Figure 7 Valid Gel Results, Example

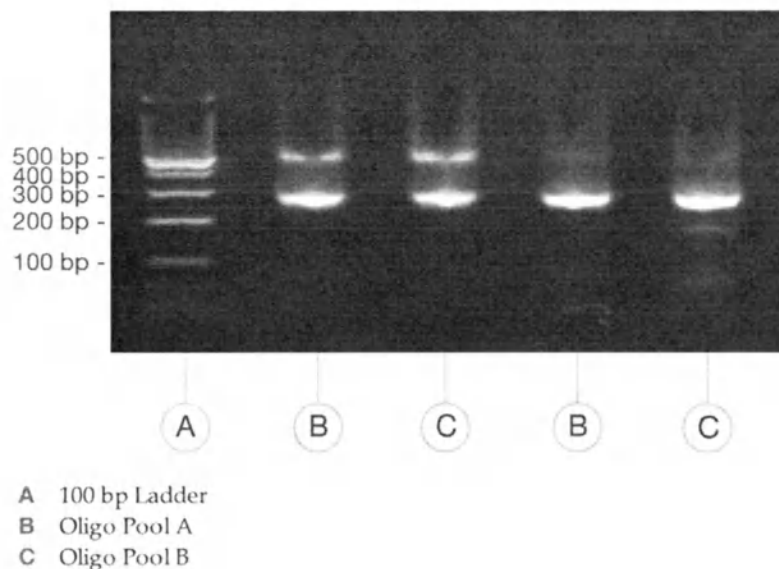
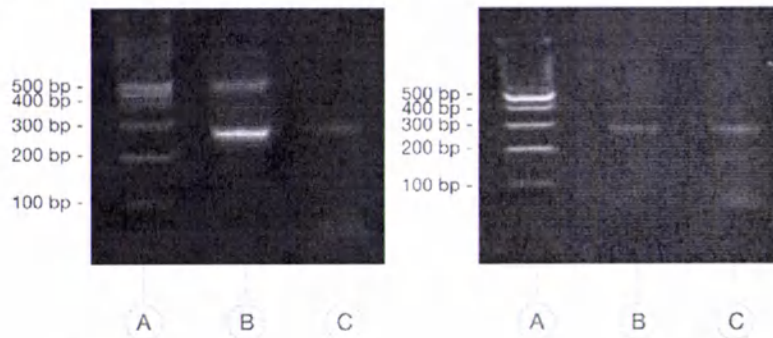
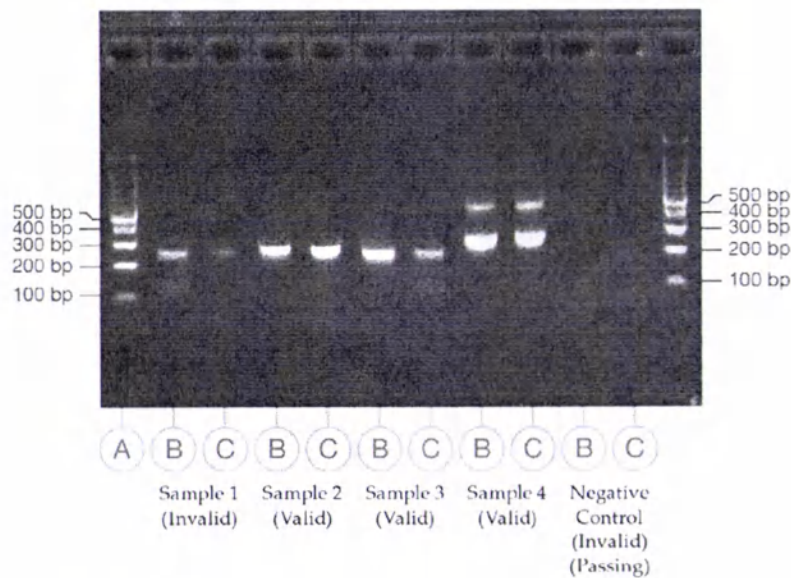


Figure 8 Invalid Gel Results, Examples



- A 100 bp Ladder
- B Oligo Pool A
- C Oligo Pool B

Figure 9 Sample Outcomes, Example



- A 100 bp Ladder
- B Oligo Pool A
- C Oligo Pool B

PCR Clean-Up

This process uses PCR Clean-Up Beads to purify the PCR products from the other reaction components.

Estimated Time

- ▶ Total duration: 50 minutes
- ▶ Hands-on: 20 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
Elution Buffer	1 tube	15°C to 30°C	Illumina	5
PCR Clean-Up Beads	1.8 ml per 12 samples/24 libraries	2°C to 8°C	Illumina	3B
80% Ethanol, freshly-prepared	15 ml per 12 samples/24 libraries	15°C to 30°C	User	—
96-well MIDI plates	2	15°C to 30°C	User	—
Adhesive plate seal	As needed	15°C to 30°C	User	—
Troughs	As needed	15°C to 30°C	User	—

Precautions



NOTE

Please review the **Precautions** section at the beginning of this protocol regarding the handling of magnetic beads and washing with 80% ethanol during the PCR clean-up.

- 1 Bring the PCR Clean-Up Beads to room temperature.
- 2 Prepare fresh 80% ethanol from absolute ethanol. For 12 samples/24 libraries, prepare 80% ethanol using 12 mL of absolute ethanol and 3 mL of DNase/RNase-free water. Mix thoroughly.



NOTE

Always prepare fresh 80% ethanol for wash steps. Ethanol can absorb water from the air impacting the results.

Procedure

- 1 Centrifuge the AMP plate at 1000 × g at room temperature for 1 minute to collect condensation.
- 2 Label a new MIDI plate "CLP_Plate_ID" (Clean-up Plate).
- 3 Invert PCR Clean-Up Beads 10 times. Vortex vigorously and then invert again 10 times.
- 4 Visually inspect solution to ensure that beads are resuspended well.
- 5 Using a multi-channel pipette, add 55 µl of PCR Clean-Up Beads to each well of the CLP plate.

- 6 Using a multi-channel pipette set to 60 μ l, transfer the entire PCR product from the **AMP** plate to the **CLP** plate. Change tips between samples.
- 7 Seal the **CLP** plate with an adhesive plate seal.
- 8 Shake the **CLP** plate on a microplate shaker at 1800 rpm for 2 minutes.
- 9 Incubate at room temperature (15°C to 30°C) without shaking for 10 minutes.
- 10 Place the plate on a magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
- 11 With the **CLP** plate on the magnetic stand and a multi-channel pipette set to 100 μ l, carefully remove and discard the supernatant. Change tips between samples.



NOTE

If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the plate and let the plate rest on the magnet for 2 minutes and confirm that the supernatant has cleared.



NOTE

Delays during this step may lead to bead clumping following removal of the supernatant. Proceed immediately to the next step as soon as all supernatant is removed.

- 12 With the **CLP** plate on the magnetic stand, wash the beads with freshly prepared 80% ethanol as follows:
 - a Using a multi-channel pipette, add 200 μ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well. Changing tips is not required if you use care to avoid cross-contamination. You do not need to resuspend the beads at this time.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for a minimum of 30 seconds or until the supernatant is clear.
 - c Carefully remove and discard the supernatant.
 - 13 With the **CLP** plate on the magnetic stand, perform a second ethanol wash as follows:
 - a Using a multi-channel pipette, add 200 μ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for a minimum of 30 seconds or until the supernatant appears clear.
 - c Carefully remove and discard the supernatant.
 - 14 Use a P20 multi-channel pipette set to 20 μ l to remove excess ethanol. Do not disturb or touch the beads.
 - 15 Remove the **CLP** plate from the magnetic stand and allow the beads to air-dry for 5 minutes.
 - 16 Using a multi-channel pipette, add 25 μ l of Elution Buffer to each sample. Changing tips is not required if you use care to avoid cross-contamination.
 - 17 Seal the plate with an adhesive plate seal.
 - 18 Shake the **CLP** plate on a microplate shaker at 1800 rpm for 5 minutes.
- 

NOTE
Ensure all samples are completely resuspended. If there are samples in which the beads are not completely resuspended, gently pipette up and down to resuspend the beads and repeat the previous two steps.
- 19 Place the **CLP** plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.

- 20 Label a new MIDI plate "LNP_Plate_ID" (Library Normalization Plate).
- 21 Using a P20 multi-channel pipette and fine tips, carefully transfer 20 µl of the supernatant from the CLP plate to the LNP plate. Change tips between samples to avoid cross-contamination.

 **NOTE**
If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the plate and let the plate rest on the magnet for 2 minutes and confirm that the supernatant has cleared.
- 22 [Optional] Transfer the remaining 5 µl of supernatant from the CLP plate to a new plate and label the plate with a run name and date. Store this plate at -25°C to -15°C until completion of the sequencing run and data analysis. The cleaned up PCR products can be used for troubleshooting efforts in the event of sample failures.
- 23 Seal the LNP plate with an adhesive plate seal, and then centrifuge at 1000 × g at room temperature for 1 minute to ensure all the supernatant is at the bottom of the well.

SAFE STOPPING POINT

After PCR Clean-Up, the plate is stable for up to 3 hours at 2°C to 8°C.

Library Normalization

This process normalizes the quantity of each library to ensure equal library representation in the pooled sample.

Estimated Time

- ▶ Total duration: 1 hour 20 minutes
- ▶ Hands-on: 30 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
Library Normalization Diluent	1 tube	-25°C to -15°C	Illumina	1B
Library Beads	1 tube	2°C to 8°C	Illumina	3B
Library Normalization Wash	2 tubes	2°C to 8°C	Illumina	3B
Library Storage Buffer	1 tube	15°C to 30°C	Illumina	5
0.1 N NaOH, freshly prepared	3 ml	15°C to 30°C	User	—
96-well skirted PCR plate	1 plate	15°C to 30°C	User	—
15 ml conical tube	1 tube	15°C to 30°C	User	—
Adhesive plate seal	As needed	15°C to 30°C	User	—

WARNING

This set of reagents contains potentially hazardous chemicals. Personal injury can occur through inhalation, ingestion, skin contact, and eye contact. Wear protective equipment, including eye protection, gloves, and laboratory coat appropriate for risk of exposure. Handle used reagents as chemical waste and discard in accordance with applicable regional, national, and local laws and regulations. For additional environmental, health, and safety information, see the SDS at support.illumina.com/sds.html.

Preparation

- 1 Prepare fresh 0.1 N NaOH by adding 30 µl of 10 N NaOH to 2970 µl of RNase/DNase-free water.
- 2 Remove Library Normalization Diluent from -25°C to -15°C storage and bring to room temperature. Use a 20°C to 25°C water bath as needed.



NOTE

Library Normalization Diluent might form visible precipitates or crystals. Before use, vortex vigorously, and then hold the tube in front of a light and visually inspect to make sure that all precipitate has completely dissolved.

- 3 Remove Library Beads and Library Normalization Wash from 2°C to 8°C storage and bring to room temperature.
Use a 20°C to 25°C water bath as needed.

- 4 Vortex Library Beads vigorously for 1 minute with intermittent inversion until the beads are resuspended and no pellet is found at the bottom of the tube when the tube is inverted.

Procedure

- 1 For 12 samples/24 libraries, add 1575 μ l of Library Normalization Diluent to a fresh 15 ml conical tube.
- 2 To homogenize beads, use a P1000 pipette set to 1000 μ l to resuspend Library Beads thoroughly by pipetting up and down 10 times.



NOTE

It is critical to completely resuspend the library bead pellet at the bottom of the tube. The use of a P1000 ensures that the beads are homogeneously resuspended and that there is no bead mass at the bottom of the tube. This is essential for achieving consistent cluster density on the flow cell.

- 3 For 12 samples/24 libraries, pipette 300 μ l of Library Beads to the tube containing Library Normalization Diluent. Mix well by inverting the tube 15–20 times.



NOTE

A P1000 set to 1000 μ l is required to resuspend the beads completely in step 2. Mix only the specified amounts of Library Normalization Diluent and Library Beads. You must store the remaining Library Normalization Diluent and Library Beads separately at their respective recommended temperatures. To preserve stability, Library Beads should never be frozen or mixed with Library Normalization Diluent if not used immediately.

- 4 Using a multi-channel pipette, add 45 μ l of the combined Library Normalization Diluent/Library Beads working solution to each well of the LNP plate containing libraries. Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.
- 5 Seal the LNP plate with an adhesive plate seal.
- 6 Shake the LNP plate on a microplate shaker at 1,800 rpm for 30 minutes.



NOTE

This 30-minute incubation is critical for proper library normalization. Incubations of greater or less than 30 minutes may affect library representation and cluster density.

- 7 Place the LNP plate on a magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
- 8 With the LNP plate on the magnetic stand, using a multi-channel pipette set to 80 μ l, carefully remove and discard the supernatant in an appropriate hazardous waste container.



NOTE

If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the plate and let the plate rest for 2 minutes or until the supernatant has cleared.

- 9 Remove the LNP plate from the magnetic stand and wash the beads with Library Normalization Wash as follows:
 - a Using a multi-channel pipette, add 45 μ l of Library Normalization Wash to each sample well.
Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.
 - b Seal the LNP plate with an adhesive plate seal.
 - c Shake the LNP plate on a microplate shaker at 1,800 rpm for 5 minutes.

- d Place the **LNP** plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
 - e Carefully remove and discard the supernatant in an appropriate hazardous waste container.
 - 10 Remove the **LNP** plate from the magnetic stand and repeat the wash with Library Normalization Wash as follows:
 - a Using a multi-channel pipette, add 45 μ l of Library Normalization Wash to each well. Changing tips between columns is not required if you use care to avoid cross-contamination.
 - b Seal the **LNP** plate with an adhesive plate seal.
 - c Shake the **LNP** plate on a microplate shaker at 1,800 rpm for 5 minutes.
 - d Place the **LNP** plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes.
 - e Carefully remove and discard the supernatant in an appropriate hazardous waste container.
 - f Seal the **LNP** plate with an adhesive plate seal.
 - 11 Centrifuge the **LNP** plate at $1000 \times g$ at room temperature for 30 seconds to collect residual wash buffer.
 - 12 Place the **LNP** plate on the magnetic stand.
 - 13 Use a P20 multi-channel pipette set to 20 μ l to remove excess Library Normalization Wash.
 - 14 Remove the **LNP** plate from the magnetic stand and add 30 μ l of 0.1 N NaOH to each well to elute the sample.
 - 15 Seal the **LNP** plate with an adhesive plate seal.
 - 16 Shake the **LNP** plate on a microplate shaker at 1,800 rpm for 5 minutes.
 - 17 During the 5-minute shake, label a new 96-well PCR plate **SGP_Plate_ID**.
 - 18 Add 30 μ l Library Storage Buffer to each well to be used in the **SGP** plate.
 - 19 After the 5-minute shake, ensure that all samples in the **LNP** plate are resuspended. If the samples are not resuspended, gently pipette those samples up and down or lightly tap the plate on the bench to resuspend the beads, then shake for another 5 minutes.
 - 20 [Optional] Centrifuge the **LNP** plate at $1000 \times g$ at room temperature for 30 seconds to collect contents to the bottom of the wells.
 - 21 Place the **LNP** plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes.
 - 22 Using a multi-channel pipette set to 30 μ l, transfer the supernatant from the **LNP** plate to the **SGP** plate. Gently pipette up and down 5 times to mix.
-  **NOTE**
If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the plate and let the plate rest for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 23 Seal the **SGP** plate with an adhesive plate seal and then centrifuge at $1,000 \times g$ at room temperature for 1 minute. Proceed immediately to Library Pooling.

Library Pooling

In preparation for cluster generation and sequencing, equal volumes of normalized library are combined, diluted in hybridization buffer, and heat denatured prior to sequencing on the MiSeqDx. PhiX is used as an internal control for sequencing.

Estimated Time

- ▶ Total duration: 10 minutes
- ▶ Hands-on: 10 minutes

Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
Library Dilution Buffer	2 tubes	-25°C to -15°C	Illumina	1B
PhiX Internal Control	2 µl	-25°C to -15°C	Illumina	1B
0.1 N NaOH, freshly prepared	2.5 ml	15°C to 30°C	User	—
1X TE buffer	8 µl	15°C to 30°C	User	—
Microcentrifuge tubes	As needed	15°C to 30°C	User	—
PCR eight-tube strip	1	15°C to 30°C	User	—
Ice bucket	1	15°C to 30°C	User	—

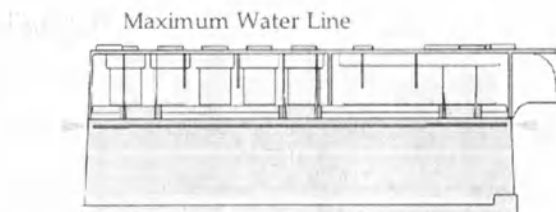
Prepare for Library Pooling

- 1 Set a heat block suitable for 1.5 ml centrifuge tubes to 96°C.
- 2 In an ice bucket, prepare an ice-water bath. Chill the Library Dilution Buffer in the ice-water bath.
- 3 Begin thawing the MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3.

Prepare for Reagent Cartridge

The following instructions describe how to thaw the reagent cartridge using a room temperature water bath. This method requires approximately one hour.

- 1 Remove the reagent cartridge from -25°C to -15°C storage.
- 2 Place the reagent cartridge in a water bath containing enough room temperature deionized water to submerge the base of the reagent cartridge up to the water line printed on the reagent cartridge. Do not allow the water to exceed the maximum water line.



- 3 Allow the reagent cartridge to thaw in the room temperature water bath for approximately 60-90 minutes or until completely thawed.
- 4 Remove the cartridge from the water bath and gently tap it on the bench to dislodge water from the base of the cartridge. Dry the base of the cartridge. Make sure that no water has splashed on the top of the reagent cartridge.

- 1 Prepare 0.1 N NaOH by combining the following volumes in a conical tube:

- ▶ DNase, RNase-free water (2475 μ l)
- ▶ Stock 10 N NaOH (25 μ l)

- 2 Invert the tube several times to mix.



CAUTION

Using freshly diluted NaOH is essential in order to denature PhiX for cluster generation on the MiSeqDx.

- 3 Combine the following volumes to make Diluted PhiX Internal Control:

- ▶ PhiX Internal Control (2 μ l)
- ▶ 1X TE Buffer (8 μ l)

- 4 Combine the following volumes of Diluted PhiX Internal Control and 0.1 N NaOH in a microcentrifuge tube to make Denatured Diluted PhiX Internal Control:

- ▶ Diluted PhiX Internal Control (10 μ l)
- ▶ 0.1 N NaOH (10 μ l)

- 5 Vortex briefly to mix the Denatured Diluted PhiX Internal Control.
- 6 Briefly centrifuge the Denatured Diluted PhiX Internal Control to collect contents.
- 7 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the PhiX Internal Control into single strands.
- 8 Combine the following volume of pre-chilled Library Dilution Buffer and Denatured Diluted PhiX Internal Control to make PhiX/Library Dilution Buffer solution.

- ▶ Denatured Diluted PhiX Internal Control (20 μ l)
- ▶ Pre-chilled Library Dilution Buffer (980 μ l)



NOTE

You can store the the PhiX/Library Dilution Buffer solution up to 3 weeks at -25°C to -15°C as single-use aliquots. After 3 weeks, cluster numbers tend to decrease.

Inspect the Reagent Cartridge

- 1 Invert the reagent cartridge ten times to mix the thawed reagents, and then inspect that all positions are thawed.

**NOTE**

It is critical that the reagents in the cartridge are thoroughly thawed and mixed to ensure proper sequencing.

- 2 Inspect reagents in positions 1, 2, and 4 to make sure that they are fully mixed and free of precipitates.
- 3 Gently tap the cartridge on the bench to reduce air bubbles in the reagents.

**NOTE**

The MiSeqDx sipper tubes go to the bottom of each reservoir to aspirate the reagents, so it is important that the reservoirs are free of air bubbles.

- 4 Place the reagent cartridge on ice or set aside at 2°C to 8°C (up to 6 hours) until ready to set up the run. For best results, proceed directly to loading the sample and setting up the run.

Preparing Samples for Sequencing

- 1 Bring Library Dilution Buffer to room temperature. Vortex Library Dilution Buffer and ensure that all precipitates have dissolved completely.
- 2 Centrifuge the **SGP** plate at 1000 × g at room temperature for 1 minute to collect condensation.
- 3 Label a fresh microcentrifuge tube "**PAL_Plate_ID**" (Pooled Amplicon Library).
- 4 Determine the samples to be pooled for sequencing. A maximum of 12 samples/24 libraries can be pooled for each sequencing run.
- 5 Transfer 10 µl of each library to be sequenced from the **SGP** plate, column by column, to a PCR eight-tube strip. Seal **SGP** with an adhesive plate seal and set aside.
- 6 Combine and transfer the contents of the PCR eight-tube strip into the **PAL** tube. Mix the **PAL** tube thoroughly.
- 7 Label 3–6 fresh microcentrifuge tubes "**DAL_Plate_ID**" (Diluted Amplicon Library).

**NOTE**

Illumina recommends creating 3 **DAL** tubes per **PAL** for future use.

- 8 Add 784 µl of Library Dilution Buffer to each **DAL** tube.
- 9 Add 8 µl of PhiX/Library Dilution Buffer solution to each **DAL** tube. Using the same tip, pipette up and down 3–5 times to rinse the tip and ensure complete transfer.
- 10 Transfer 8 µl of **PAL** to each **DAL** tube containing Library Dilution Buffer. Using the same tip, pipette up and down 3–5 times to rinse the tip and ensure complete transfer.
- 11 Mix the **DAL** tubes by vortexing the tube at top speed.

**NOTE**

The diluted library **DAL** can be stored at -25°C to -15°C for up to 30 days.

- 12 Centrifuge the one **DAL** tube at room temperature for 1 minute to collect contents.
- 13 Using a heat block, incubate the **DAL** tube at 96°C for 2 minutes.

**WARNING**

Use caution when removing the tube. The tube and the heat block may be hot.

- 14 After the incubation, invert the **DAL** tube 1–2 times to mix, then immediately place in the ice-water bath.

- 15 Keep the DAL tube in the ice-water bath for 5 minutes.



NOTE

You must perform the heat denaturation step immediately before loading DAL into the MiSeq™ SBS cartridge v3 to ensure efficient template loading on the MiSeq™ Dx flow cell. Replicate DAL tubes must be heat denatured immediately before MiSeqDx loading.

Library Sequencing

The flow cell is washed, dried, and loaded into MiSeqDx, samples are loaded into the reagent cartridge, the reagent cartridge is loaded into MiSeqDx, and the sequencing run is started. The MiSeqDx performs cluster generation, sequencing by synthesis, and data analysis.

Estimated Time

- ▶ Total sequencing duration: ~28 hours
- ▶ Hands-on: ~5 minutes

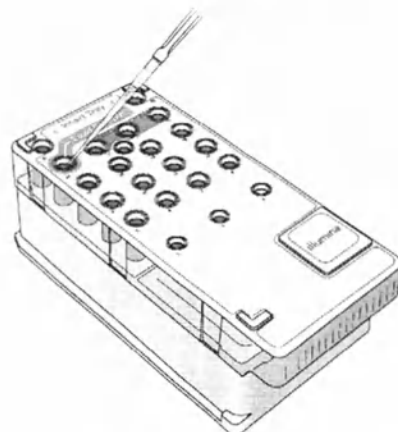
Consumables

Item	Quantity	Storage	Supplied By	Kit Box
MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3	1 pre-filled cartridge	-25°C to -15°C	Illumina	2
MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)	1 bottle	2°C to 8°C	Illumina	4
MiSeq™ Dx Flow Cell	1 flow cell	2°C to 8°C	Illumina	3B

For details on the steps outlined here, see the *MiSeqDx Instrument Reference Guide* (document # 1000000021961).

- 1 Use a separate, clean, and empty 1 ml pipette tip to pierce the foil seal over the reservoir on the MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3 labeled **Load Samples**.
- 2 Pipette 600 µl of the sample DAL libraries into the **Load Samples** reservoir. Take care to avoid touching the foil seal while dispensing the sample.
- 3 Check for air bubbles in the reservoir after loading sample. If air bubbles are present, gently tap the cartridge on the bench to release the bubbles.

Load Libraries



- 4 Log in to the MiSeq Operating Software (MOS) using your Local Run Manager user name and password.



NOTE

If a previous user is logged in, select **Log Off** before logging in. Confirm that the proper username or login credentials are displayed.

- 5 From the Home screen, select **Sequence**.
- 6 Select a run from the list.
- 7 Confirm the run settings.
- 8 Clean the flow cell.
- 9 Load the flow cell.
- 10 Empty the waste bottle and load the MiSeq[™] Dx SBS Solution (PR2) bottle.
- 11 Load the reagent cartridge.
- 12 The run automatically starts after passing pre-run checks.
- 13 Perform a post-run wash.



[This page intentionally left blank]

Technical Assistance

For technical assistance, contact Illumina Technical Support.

Website: www.illumina.com
Email: techsupport@illumina.com

Illumina Customer Support Telephone Numbers

Region	Toll Free	Regional
North America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgium	+32 80077160	+32 34002973
China	400.635.9898	
Denmark	+45 80820183	+45 89871156
Finland	+358 800918363	+358 974790110
France	+33 805102193	+33 170770446
Germany	+49 8001014940	+49 8938035677
Hong Kong	800960230	
Ireland	+353 1800936608	+353 016950506
Italy	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Netherlands	+31 8000222493	+31 207132960
New Zealand	0800.451.650	
Norway	+47 800 16836	+47 21939693
Singapore	+1.800.579.2745	
Spain	+34 911899417	+34 800300143
Sweden	+46 850619671	+46 200883979
Switzerland	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	00806651752	
United Kingdom	+44 8000126019	+44 2073057197
Other countries	+44.1799.534000	

Safety data sheets (SDSs)—Available on the Illumina website at support.illumina.com/sds.html.



Document # 100000037191 v00

[This page intentionally left blank]



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (outside North America)
techsupport@illumina.com



Illumina

**Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для
качественного определения специфических мутаций генов
RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2, 3 и 4)
методом секвенирования нового поколения в пробе
геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей
колоректального рака, фиксированных в формалине, и
заключенных в парафиновые блоки**

Руководство справочное

Производитель:

**«Иллюмина, Инк.»
(Illumina, Inc.)**

Адрес:

**5200 Иллюмина Уэй, Сан-Диего, Калифорния 92122, США
(5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)**

Утверждено

Со стороны Иллюмина, Инк.

/подпись/

**Аурелия Браунридж
Главный специалист нормативно-правового отдела
Illumina, Inc.**

Дата: 14 мая 2020 г



**МАРИ АГОСТИНО
Нотариус штата Калифорния
Округ Сан-Диего
Лицензия нотариуса № 2282390
«Срок моих полномочий истекает
23 марта 2023 г»**

НОТАРИАЛЬНОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

Государственный нотариус или другое должностное лицо, заполняющее настоящий сертификат, подтверждает только личность физического лица, подписавшего документ, к которому приложен настоящий сертификат, но не отвечает за достоверность, точность или действительность такого документа.

Штат Калифорния

Округ Сан-Диего)

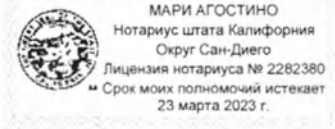
14 мая 2020 г. в моем присутствии, Мари Агостино, нотариуса
(вставить ФИО и должность должностного лица)

Аурелиа Браунридж лично

подтвердила на основании убедительных доказательств, что она является лицом, чьим именем подписан документ, и заверила меня, что она подписала его в силу имеющихся у нее полномочий, а также, что проставлением ее подписи на документе физическое или юридическое лицо, от имени которого лицо действовало, исполнило данный документ.

ОСОЗНАВАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ, в соответствии с законодательством Штата Калифорния, я подтверждаю, что вышеизложенная информация является верной.

УДОСТОВЕРЯЮ СОБСТВЕННОРУЧНОЙ ПОДПИСЬЮ И ОФИЦИАЛЬНОЙ ПЕЧАТЬЮ,



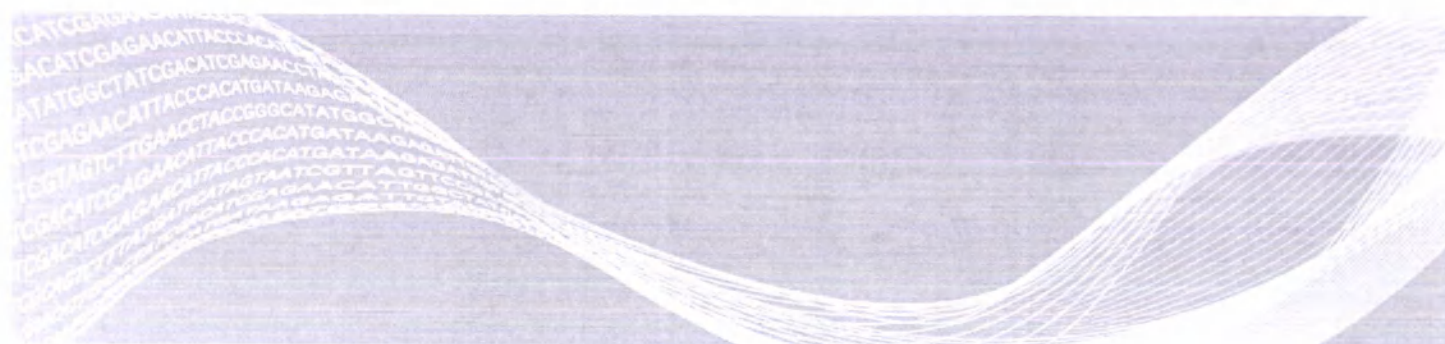
Подпись _____ /подпись/ _____ (Печать)

TruSight™ T1000 RAS Panel

Руководство справочное

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

Введение	4
Начало работы.....	7
Процесс проведения анализа	18
Оценка качества ДНК образцов FFPE	18
Настройка параметров.....	25
Гибридизация пула праймеров	28
Удаление несвязавшихся праймеров	32
Элонгация-лигирование связавшихся праймеров.....	35
ПЦР-амплификация	36
Проверка полученной библиотеки	40
Очистка ПЦР-продуктов	42
Нормализация библиотек.....	45
Объединение библиотек.....	49
Секвенирование библиотеки	53
Техническое сопровождение	56



Документ № 1000000037191 v00
Август 2017
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

ЗАЩИЩЕНО ПРАВОМ СОБСТВЕННОСТИ
«ИЛЛЮМИНА»

Этот документ и его содержание являются собственностью компании «Иллюмина, Инк.» и ее дочерних компаний («Иллюмина») и предназначены для использования заказчиком исключительно на договорной основе в связи с применением описанного (ых) в настоящем документе изделия(й), а не для иных целей. Не допускается использование или распространение этого документа и его содержания в каких-либо иных целях и/или его передача, разглашение или воспроизведение содержания каким-либо иным путем без предварительного письменного согласия компании «Иллюмина». Данный документ не предусматривает передачу компанией «Иллюмина» каких-либо лицензий в соответствии с ее патентом, товарным знаком, авторскими правами или общими законодательными правами, а также аналогичных прав какой-либо третьей стороне.

В целях гарантии правильного и безопасного использования описанного(ых) в настоящем документе изделия(й) квалифицированный и надлежащим образом подготовленный персонал обязан строго следовать инструкциям, представленным в данном документе. Перед использованием такого(их) изделия(й) необходимо полностью прочесть и понять все содержание данного документа.

ЧАСТИЧНОЕ ПРОЧТЕНИЕ И НЕСОБЛЮЖДЕНИЕ ИНСТРУКЦИЙ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ(Й), ТРАВМИРОВАНИЮ ПЕРСОНАЛА, В ТОМ ЧИСЛЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ИЛИ ДРУГИХ ЛИЦ, И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИНОГО ИМУЩЕСТВА.

КОМПАНИЯ «ИЛЛЮМИНА» НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПИСАННОГО(ЫХ) В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ ИЗДЕЛИЯ(Й) (В ТОМ ЧИСЛЕ ЕГО СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ ИЛИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© 2017 Illumina, Inc. Все права защищены.

Illumina, Genetic Energy, MiSeqDx, Powered by Illumina, Praxis, TruSeq и дизайн являются зарегистрированными или ожидающими регистрации товарными знаками компании «Иллюмина, Инк.» и/или ее дочерней(их) компании(й) в США и/или в других странах. Все остальные названия, логотипы и другие товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

Данное изделие можно использовать в качестве компонента медицинских молекулярно-диагностических анализов, если это разрешено применимым законодательством страны. Само изделие не обеспечивает какой-либо диагностический результат. Данное изделие включает в себя полимеразу GoTaq® Hot Start производства компании «Промега Корпорейшн» (Promega Corporation) для распространения компанией «Иллюмина, Инк.» по лицензии компании «Промега Корпорейшн» в соответствии с патентами США №№ 5,338,671 и 5,587,287 и их соответствующими иностранными патентами.



ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПОКУПАТЕЛЯ: ОГРАНИЧЕННОЕ ЛИЦЕНЗИРОВАНИЕ

За пределами США использование данного изделия осуществляется в соответствии с одним или более из следующих патентов США и соответствующих патентных формул: 5,994,056 и 6,171,785. Приобретение данного изделия включает ограниченное, не подлежащее передаче судебное право в соответствии с вышеуказанными патентными формулами на использование только данного количества изделия исключительно в области гарантии качества и контроля качества изделий и способов в области медицинской диагностики *in vitro*, включая без ограничений соблюдение спецификаций, чистоту и соответствие между сериями, а также включая отчеты о результатах деятельности покупателя в отношении оплаты услуг или других коммерческих вопросов. Передача прав в соответствии с какой-либо иной патентной формулой явным образом, посредством применения на практике или посредством лишения права возражения не допускается. Для получения дополнительной информации о приобретении лицензий обращайтесь на сайт outlicensing@lifetech.com или по адресу: отдел предоставления лицензий, «Лайф Текнолоджиз» (Life Technologies), 5791 Ван-Аллен-Вэй, г. Карлсбад, штат Калифорния 92008, США.

Введение

Цели и задачи

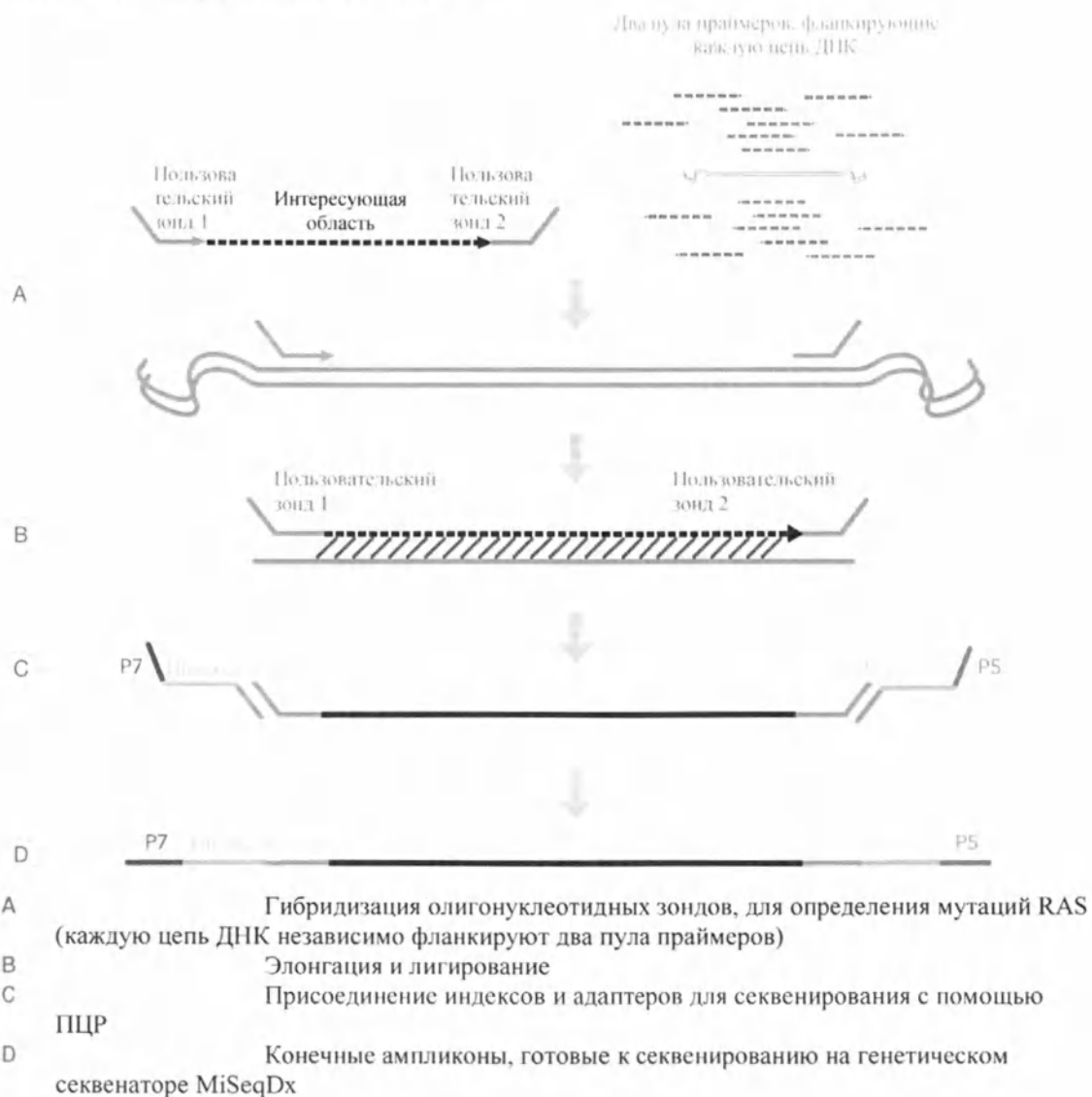
Набор реагентов PraxisTM Extended RAS Panel представляет собой набор для качественного определения статуса 56 специфических мутаций генов RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака (CRC), фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (FFPE) для диагностики *in vitro*. Этот набор предусмотрен для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx компании Иллюмина (Illumina).

Цели и задачи руководства

В данном руководстве включены более подробные инструкции, технические тонкости и полезные советы для вновь обучающихся пользователей, чтобы помочь им правильно выполнять протокол с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Оно предложено в качестве дополнения и не должно заменять инструкцию по применению.

Область применения

Наборы праймеров, фланкирующие специфические области, в генах RAS содержащие мутации гибридизуются на геномную ДНК. Каждый образец геномной ДНК протестирован с двумя пулами праймеров, которые независимо фланкируют каждую цепь ДНК с последующей достройкой цепи и лигированием для формирования образцов ДНК, содержащих регионы интереса, фланкированные последовательностями универсальных праймеров. Используя праймеры индексированные, поставляемые в наборе, ДНК образцы затем амплифицируются в ПЦР, смешиваются в одну пробирку и секвенируются на генетическом секвенаторе MiSeqDx.



Процесс работы с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel можно кратко описать следующими стадиями:

Создание рабочего цикла

Прежде всего создают рабочий цикл. Генетический секвенатор MiSeqDx использует информацию о рабочем цикле для идентификации каждого образца и ему соответствующих индексов.

Чтобы создать рабочий цикл, используют программу Local Run Manager и модуль анализа данных, полученных с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. В этот модуль вводят название образца и индексы для 96-луночного планшета. С модуля можно распечатать схему нанесения на планшет и использовать эту информацию для постановки реакции в планшете во время рабочего процесса.

Приготовление библиотек

Библиотеки готовят, используя протокол, подробно описанный в данном руководстве пользователя.

Секвенирование образцов на приборе генетический секвенатор MiSeqDx

Библиотека, приготовленная с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel секвенируется на генетическом секвенаторе MiSeqDx методом парно-концевого чтения, 141 цикл с двойным индексированием. Инструкции по выполнению рабочего цикла секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx см. в документе *Справочное руководство прибора генетический секвенатор MiSeqDx (документ №1000000021961)*.

Автоматическое секвенирование и анализ данных

Модуль анализа данных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel обрабатывает нуклеотиды, сгенерированные на генетическом секвенаторе MiSeqDx. Это встроенное программное обеспечение прибора. Модуль анализа выдает подробную информацию, показывающую наличие в образцах какой-либо из мутаций, включенных в анализ по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel. Дополнительную информацию по этому программному обеспечению см. в разделах *Справочное руководство к генетическому секвенатору MiSeqDx «Программный модуль Local Run Manager» (документ №1000000011880)* и *Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis Extended RAS Panel (документ №1000000011875)*.

Компания «Иллюмина» предлагает следующие средства отслеживания образцов и управления в лаборатории:

- Форма Lab Tracking Form может быть использована для регистрации такой информации, как имя оператора, информация об образце и индексе, время начала и окончания, номера партий реагентов и штрих-коды.
- Модуль для анализа данных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel используется для создания рабочего цикла. Модуль обеспечивает процессы для регистрации параметров планшета образцов, например, таких как, наименование образца и двойные индексы, применяемые в рабочем цикле.

Часть 1: Подготовка

Этот раздел содержит информацию о составе набора реагентов Praxis Extended RAS Panel, используемых расходных материалах и оборудовании, рекомендации по количеству вносимой ДНК и практические рекомендации по исполнению этапов протокола.

Часть 2: Состав набора реагентов Praxis Extended RAS Panel

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (№ по каталогу 20012431) содержит следующие компоненты. Храните компоненты набора реагентов при указанной температуре в предусмотренных пре-амплификационной и пост-амплификационной зонах.

В связи с тем, что реагенты, используемые до и после амплификации, поставляются вместе, важно их распаковать в пре-амплификационной зоне лаборатории, а затем перенести реагенты, используемые после амплификации, в надлежащее место хранения в пост-амплификационной зоне.

Коробка 1А: Реагенты пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)	1 пробирка	4,32 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли и формамид	-25 °C -- 15 °C
Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)	1 пробирка	4,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий патентованную смесь ДНК-полимераз, ДНК-лигазы и дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP)	-25 °C -- 15 °C
Праймеры индексированные А (A501) – Н (A508) (Index Primers A (A501) – Н (A508))	1 пробирка для каждого праймера	192 мкл	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования	-25 °C -- 15 °C
Праймеры индексированные I (A701) – 12 (A712) (Index Primers I (A701) - 12 (A712))	1 пробирка для каждого праймера	128 мкл	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования	-25 °C -- 15 °C
ПЦР полимеразы (PCR Polymerase)	1 пробирка	56 мкл	Патентованная ДНК-полимераза	-25 °C -- 15 °C
Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)	1 пробирка	2,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли и dNTPs	-25 °C -- 15 °C

Коробка 1В: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)	1 пробирка	4,6 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид	-25 °C – -15 °C
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)	2 пробирки	4,5 мл	Водный буферный раствор	-25 °C – -15 °C
Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)	1 пробирка	10 мкл	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК PhiX	-25 °C – -15 °C

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel, коробка 2

Коробка 2: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Содержимое	Хранение
Картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3)	2 картриджа	Картридж однократного применения, содержащий реагенты для образования кластеров и секвенирования для применения с генетическим секвенатором MiSeqDx, в том числе формамид, 2-меркаптоэтанол и <2% ДМСО	-25 °C – -15 °C

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel, коробка 3

Коробка 3А: Реагенты для пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)	1 флакон	24 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид	2 °C – 8 °C
Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)	1 пробирка	4,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли	2 °C – 8 °C

Коробка 3В: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads)	1 пробирка	5 мл	Водный буферный раствор, содержащий твердофазные парамагнитные частицы и полиэтиленгликоль	2 °C – 8 °C
Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)	2 пробирки	4,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид	2 °C – 8 °C

Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)	1 пробирка	1,2 мл	Водный буферный раствор, содержащий твердофазные парамагнитные гранулы	2 °C – 8 °C
Ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell)	2 резервуара	1 проточная ячейка	Стеклянная подложка с ковалентно связанными олигонуклеотидами	2 °C – 8 °C

Коробка 4: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))	2 флакона	500 мл	Водный буферный раствор	2 °C – 8 °C

Коробка 5: Реагенты для пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)	2 планшета	Н/П	Полипропиленовый микропланшет с мембраной из модифицированного полиэфирсульфона	15 °C – 30 °C

Коробка 5: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер для элюции (Elution Buffer)	1 пробирка	4,8 мл	Водный буферный раствор	15 °C – 30 °C
Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)	1 пробирка	3,5 мл	Водный буферный раствор	15 °C – 30 °C

Коробка 6: Реагенты для пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)	1 пробирка	150 мкл	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды, нацеленные на гены RAS	-25 °C – 15 °C

Пул праймеров В (Oligo Pool B – Extended RAS)	1 пробирка	150 мкл	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды, нацеленные на гены RAS	-25 °C – -15 °C
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	4 пробирки	75 мкл	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды для оценки качества образца ДНК	-25 °C – -15 °C
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)	1 пробирка	220 мкл	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК для оценки качества образца ДНК	-25 °C – -15 °C
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	2 пробирки	1 мл	Водный буферный раствор, содержащий компоненты реакции количественной ПЦР	-25 °C – -15 °C
Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)	1 пробирка	8 мкл	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК для положительного контроля	-25 °C – -15 °C

10 N NaOH (готовят из таблеток или используют стандартный раствор)
 Буфер TE
 Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз

Реагенты

10 N NaOH (готовят из таблеток или используют стандартный раствор)
 Этанол, 200 для молекулярной биологии
 Буфер TE
 Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз

- 1 **Прибор генетический секвенатор MiSeqDx, № по каталогу DX-410-1001**
- 2 **TruSeq® Index Plate Fixture Kit, № по каталогу FC-130-1005**
- 3 **TruSeq® Index Plate Fixture & Collar Kit, № по каталогу FC-130-1007**

Оборудование и материалы для подготовки до амплификации

- 1 **Реагенты для выделения и очистки ДНК** — дополнительную информацию об выделения ДНК см. в инструкции по применению.
- 2 **Термоблок** — необходим один термоблок для 96-луночного планшета для ПЦР. Термоблок должен обладать следующими техническими характеристиками.

Необходимо использовать термоблоки с нагреваемыми крышками.

- Диапазон температуры: комнатная температура +5 °C – 99 °C
- Регулирование температуры: $\pm 0,1$ °C при 37 °C; $\pm 0,4$ °C при 60 °C

- 3 **Термостат для образцов** — необходим один термостат (термостат для гибридизации). Термостат должен обладать следующими техническими характеристиками.
- Диапазон температуры: 10 °C – 100 °C
 - Регулирование температуры: $\pm 0,2$ °C

- 4 **Настольная центрифуга** — необходима одна настольная центрифуга. (Для постамплификационной зоны требуется отдельная). Приемлема любая центрифуга для планшетов, позволяющая достичь скоростей, указанных в протоколе (от 280 до 2400 $\times$ g).

- 5 **Микроцентрифуга** — одна микроцентрифуга для центрифужных микропробирок.

- 6 **Прецизионные пипетки** — необходим один комплект высокоточных пипеток. (Для постамплификационной зоны требуется отдельный набор пипеток). Использование прецизионных пипеток необходимо для обеспечения точного внесения реагентов и исследуемых образцов. Можно использовать одноканальные или многоканальные пипетки при условии их регулярной калибровки и точности в пределах 5% указанного объема.

- 7 **Роликовое или клиновидное устройство для запечатывания планшетов** — роликовое или клиновидное устройство для запечатывания планшетов необходимо для запечатывания микропланшетов.

- 8 **Расходные материалы** — необходимы следующие расходные материалы.
- 96-луночные или 384-луночные оптические планшеты и пленки для ПЦР
 - 96-луночные планшеты для ПЦР с юбкой, 0,2 мл, из полипропилена или эквивалентные
 - 96-луночные планшеты для хранения, 0,8 мл (планшеты MIDI)



ПРИМЕЧАНИЕ

Убедитесь, что 96-луночный планшет хорошо подходит к магнитному штативу.

- Стрипы на восемь пробирок для ПЦР
- Ванночка (лоток) для растворов, ПВХ, свободный от РНКаз/ДНКаз
- Устройство для термического запечатывания микропланшетов



ПРИМЕЧАНИЕ

При отсутствии устройства для термического запечатывания микропланшетов можно использовать адгезивную пленку из алюминиевой фольги.

- Адгезивная пленка из алюминиевой фольги
- Подходящие пленки для ПЦР-планшетов
- Наконечники для пипеток с аэрозольным фильтром

Оборудование и материалы, используемые после амплификации

- 1 **96-луночная или 384-луночная система детектирования для количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени** — необходима одна система детектирования для количественной ПЦР в режиме реального времени. Система должна иметь нагреваемую крышку и поддерживать 96-луночный или 384-луночный формат и обладать следующими техническими характеристиками..
- Минимальный диапазон температуры: 37 °C – 95 °C
 - Точность/однородность: $\pm 0,5$ °C
 - Краситель: FAM

- 2 **Термоциклер** — необходим один термоциклер. Термоциклер должен иметь нагреваемую крышку и обладать следующими техническими характеристиками:
- Минимальный диапазон контроля температуры: 4 °C – 99 °C

- Точность контроля: $\pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3 **Оптическая прокладка для компрессии** — оптическая прокладка для компрессии рекомендуется для обеспечения надлежащей температуры пленки между термоциклером для ПЦР и реакционными планшетами при использовании клеящихся пленок для планшетов.
- 4 **Шейкер для микропланшетов** — для работы в постамплификационной зоне лаборатории необходим один шейкер для микропланшетов. шейкер для микропланшетов должен обладать следующими техническими характеристиками.
- Максимальная скорость перемешивания: 3000 об/мин
 - Диапазон скорости перемешивания: от 200 до 3000 об/мин
- 5 **Настольная центрифуга** — необходима одна настольная центрифуга. (Отдельная центрифуга требуется для преамплификационной зоны). Приемлема любая центрифуга для планшетов, позволяющая достичь скоростей, указанных в протоколе (от 280 до $2400 \times g$).
- 6 **Термоблок** — необходим один термоблок для пробирок. Термоблок должен обладать следующими техническими характеристиками.
- Диапазон температуры: $+5\text{ }^{\circ}\text{C} - 99\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Регулирование температуры: $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 7 **Магнитный штатив** — необходим один магнитный штатив для 96-луночного планшета. Лучшая воспроизводимость отмечена при расположении магнитов сбоку, а не на дне штатива.
- 8 **Прецизионные пипетки** — необходим один комплект прецизионных пипеток. (Для работы в преамплификационной зоне требуется отдельный комплект). Использование прецизионных пипеток необходимо для обеспечения точного дозирования вносимых реагентов и исследуемых образцов. Можно использовать одноканальные или многоканальные пипетки при условии их регулярной калибровки и точности в пределах 5% указанного объема.
- 9 **Принадлежности для гель-электрофореза** — необходимые принадлежности и прибор для электрофореза должны соответствовать методике окрашивания для визуализации продуктов ПЦР в геле.
- 10 **Расходные материалы** — необходимы следующие расходные материалы.
- 96-луночные планшеты для ПЦР с юбкой, 0,2 мл, из полипропилена или эквивалентные
 - 96-луночные планшеты для хранения, 0,8 мл (планшеты MIDI)
- ПРИМЕЧАНИЕ**
- Убедитесь, что 96-луночный планшет хорошо подходит к магнитному штативу.
- 2-4%-ный агарозный гель на трис-боратном буфере (ТБЕ)
 - Маркер молекулярной массы ДНК 100 п. о.
 - Краситель для нанесения ДНК на гель
 - Конические пробирки емкостью 15 мл
 - Центрифужные микропробирки
 - Стрипы на восемь пробирок для ПЦР
 - Ванночки (лотки) для растворов, из ПВХ, свободные от РНКаз/ДНКаз
 - Клеящиеся пленки для запечатывания планшетов
 - Наконечники для пипеток с аэрозольным фильтром

Предупреждение: копировать продукты ПЦР

Метод ПЦР часто используют в лаборатории для амплификации определенных последовательностей ДНК. При несоблюдении надлежащих правил работы в лаборатории продукты ПЦР могут загрязнять реагенты, приборы и образцы геномной ДНК, что приводит к

неправильным и недостоверным результатам. Контаминация продуктами ПЦР может привести к задержке или прекращению работы лаборатории.

Убедитесь, что лаборатория организована надлежащим образом, чтобы уменьшать риск контаминации продуктами ПЦР:

Физически разделите пре- и постаmplификационную зоны

- ▶ Лабораторные площади, где выполняют процессы подготовки образцов к амплификации (выделение, количественное определение и нормализация ДНК), должны быть отделены от лабораторных площадей, где выполняют процессы после амплификации.
- ▶ Для промывки лотков, используемых до и после амплификации, никогда не используйте одну и ту же раковину.
- ▶ Ни в коем случае не используйте одну и ту же систему очистки воды для процессов подготовки к амплификации и выполняемых после амплификации.
- ▶ Храните все используемые в протоколах расходные материалы в преамплификационной зоне и по мере необходимости переносите их в постаmplификационную зону.

Использование специального оборудования и расходных материалов

- ▶ Выделите полные комплекты оборудования и расходных материалов (пипетки, центрифуги, термостат, термоблок и т. д.), специально предназначенные для процессов, выполняемых до и после амплификации, и ни в коем случае не используйте одни и те же комплекты для разных процессов.
- ▶ Выделите специальные зоны хранения (холодильники и морозильные камеры) для хранения расходных материалов, используемых до и после амплификации.

В связи с тем, что реагенты, используемые до и после амплификации, перевозят вместе, важно распаковать реагенты в преамплификационной зоне лаборатории, а затем перенести реагенты, используемые после амплификации, в надлежащее место хранения в постаmplификационной зоне.

Для предотвращения контаминации продуктами ПЦР важно разработать лабораторные стандартные операционные процедуры и следовать правилам надлежащей лабораторной практики. Компания «Иллюмина» рекомендует проводить ежедневную и еженедельную влажную уборку лабораторных помещений 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Чтобы предотвратить деградацию исследуемого образца или реагента, перед началом любого процесса работы убедитесь, что все пары моющего раствора полностью улетучились.

Ежедневная влажная уборка преамплификационной зоны

Ежедневная влажная уборка преамплификационной зоны 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем) помогает устранить продукты ПЦР, которые могли попасть в преамплификационную зону.

Определите преамплификационные зоны, представляющие наибольший риск контаминации, и промывайте эти зоны 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем) до начала любых процессов подготовки образцов к амплификации. Зоны высокого риска могут включать следующее:

- ▶ Рабочие поверхности столов
- ▶ Дверные ручки
- ▶ Ручки дверцы холодильника/морозильной камеры

Мышь для компьютера
Клавиатуры

Ежедневная влажная уборка постаmplификационной зоны

Уменьшение количества продуктов ПЦР в постаmplификационной зоне помогает снизить риск контаминации в преамплификационной зоне. Для достижения этой цели нужно выполнять ежедневную влажную уборку постаmplификационной зоны 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем).

Определите постаmplификационные зоны, представляющие наибольший риск контаминации, и ежедневно промывайте эти зоны 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем). Зоны высокого риска могут включать следующее:

Термоциклеры
Место работы с амплифицированной ДНК на рабочем столе
Дверные ручки
Ручки дверцы холодильника/морозильной камеры
Мышь для компьютера
Клавиатуры

Еженедельная влажная уборка всех помещений лаборатории

Раз в неделю проводите тщательную влажную уборку зон работы до и после амплификации 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем). Протирайте все рабочие поверхности столов и лабораторные поверхности. Промывайте все инструменты, не подлежащие ежедневной промывке. Тщательно вымойте полы в лаборатории. Убедитесь, что персонал, ответственный за еженедельную уборку, имеет надлежащую подготовку по предотвращению контаминации продуктами ПЦР.

Предметы, упавшие на пол

Пол загрязняется продуктами ПЦР, которые переносятся на обуви лиц, приходящих из постаmplификационной зоны; поэтому любой предмет, упавший на пол, необходимо обрабатывать как контаминированный.

Упавшие на пол предметы одноразового использования, например, пустые пробирки, наконечники для пипеток, перчатки, вешалки для лабораторных халатов, необходимо выбрасывать.

Упавшие на пол предметы для многократного использования, например пипетку или контейнер с важными образцами, необходимо немедленно тщательно промыть 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия (10%-ным отбеливателем).

Промойте любую поверхность в лаборатории, контактировавшую с контаминированным предметом. Лицам, обращавшимся с любым упавшим на пол предметом одноразового или многократного использования, необходимо выбросить лабораторные перчатки и надеть новую пару.

Правила предотвращения

При приготовлении библиотек для секвенирования с использованием данного протокола соблюдайте следующие рекомендации.

Обеспечение единообразия

Используйте многоканальные пипетки — для обеспечения единообразия всех исследуемых образцов, по возможности используйте многоканальную пипетку. Проводите регулярную калибровку пипеток.

Единообразие для меньшего количества образцов — каждая пробирка с реагентом, поставляемая с набором, содержит достаточный объем для получения результатов при использовании стандартных лабораторных методов с использованием ручных пипеток и лотков для реагентов. Чтобы гарантировать точное внесение необходимого объема реагента,

переносите реагент в каждую лунку планшета одной пипеткой или многоканальной пипеткой из стрипов на 8 пробирок для ПЦР, содержащих аликвоты реагента.

Работа с магнитными микрочастицами

- **Работа при комнатной температуре** — перед использованием выдерживайте микрочастицы до достижения комнатной температуры.
- **Тщательно перемешивайте на вортексе** — непосредственно перед использованием перемешайте тщательно микрочастицы на вортексе, до появления однородного цвета.
- **Тщательно перемешивайте образцы** — после добавления микрочастиц к образцам тщательно перемешайте их пипеткой (вверх и вниз десять раз). Компания «Иллюмина» также рекомендует использовать шейкер для тщательного перемешивания образцов.
- **Обеспечивайте максимальное связывание** — для получения лучших результатов инкубируйте смесь образца с микрочастицами при комнатной температуре в течение всего указанного в протоколе периода времени.
- **Отбирайте осветленный раствор медленно** — после помещения планшета на магнитный штатив дождитесь, чтобы раствор стал прозрачным, после чего переходите к следующей стадии. Удерживая планшет на магнитном штативе, медленно отбирайте пипеткой осветленный раствор, не касаясь микрочастиц.

Предотвращение перекрестной контаминации

- **Меняйте наконечники перед раскапыванием реагентов и образцов** — между раскапыванием реагентов и образцов всегда используйте новый наконечник для пипетки.
- **Перемешивайте содержимое планшетов согласно инструкции** — перемешивайте образцы многоканальной пипеткой и, если указано, центрифугируйте планшет. Не используйте вортекс для планшетов.
- **Используйте наконечники с аэрозольным фильтром** — использование наконечников с аэрозольным фильтром уменьшает риск переноса ампликонов и кросс-контаминации между исследуемыми образцами.

Промывка 80%-ным раствором этанола на стадии очистки продуктов ПЦР

- **Готовьте свежий 80%-ный раствор этанола** — для стадий промывки всегда готовьте свежий 80%-ный раствор этанола. Этанол может поглощать воду из воздуха, что влияет на результаты.
- **Полностью удаляйте этанол из лунок** — убедитесь, что этанол полностью удален со дна лунок, поскольку он может содержать остаточные растворы. Для удаления остаточного этанола и ускорения высушивания используйте многоканальную пипетку P20.
- **Обеспечивайте полное испарение** — оставьте планшет по меньшей мере на пять минут при комнатной температуре вне магнитного штатива для полного испарения. Остаточный этанол в лунках может повлиять на эффективность последующих реакций.

Требования к вносимой ДНК

- В наборе реагентов Praxis Extended RAS Panel предусмотрено использование геномной ДНК, выделенной из фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) образцов ткани колоректального рака (CRC).
- **Оценка качества ДНК** — последовательность действий по проведению анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel начинается со стадии определения качества ДНК, путем измерения амплифицируемого количества ДНК в образце относительно контрольной матрицы. Этот тест определяет разницу количества циклов (значение дельта Cq) для каждого образца относительно контрольной матрицы.

Образцы геномной ДНК (гДНК), позволяющие получить величину дельта-Cq, меньшую или равную 5,00, можно использовать для анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Illumina не рекомендует использование образцов геномной ДНК с величиной дельта-Cq

более 5,00 для исследований с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel .

Контроль качества

В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики в каждый рабочий цикл обязательно должен быть включен контрольный образец и отрицательный контрольный образец (без матрицы).

Аббревиатуры для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel

Аббревиатура	Определение
AMP	Планшет для амплификации (AMplification Plate)
CLP	Планшет для очистки (CLean-up Plate)
DAL	Разведенная библиотека ампликонов (Diluted Amplicon Library)
FPU	Устройство для фильтрования в планшете (Filter Plate Unit)
HYB	Планшет для гибридизации (HYBridization Plate)
LNP	Планшет для нормализации библиотеки (Library Normalization Plate)
NTC	Отрицательный контроль/без матрицы (Negative/No Template Control)
PAL	Объединенная библиотека ампликонов (Pooled Amplicon Library)
SGP	Планшет для хранения (StoraGic Plate)

Процесс проведения анализа

На приведенной ниже схеме представлен процесс работы с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel. Точки безопасной остановки отмечены между стадиями.

Схема процесса проведения анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS

Panel

Оценка качества ДНК, выделенной из образцов FFPE
 Ручные операции: 60 мин
 Инкубация: 30 мин
 Реагенты
 ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)
 Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)
 Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)
 Результат
 Планшет

Гибридизация пула праймеров
 Ручные операции: 15 мин
 Инкубация: 3-18 ч
 Реагенты
 Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)
 Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)
 Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)
 Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)
 Результат
 Планшет HYB

Удаление несвязавшихся праймеров
 Ручные операции: 25 мин
 Реагенты
 Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)
 Буфер универсальный промывочный (Universal Wash Buffer)
 Результат
 Планшет FPU

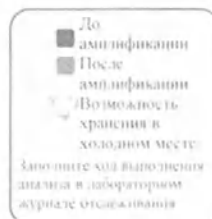
Элонгация-лигирование связавшихся праймеров
 Ручные операции: 5 мин
 Инкубация: 45 мин
 Реагенты
 Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)
 Результат
 Планшет FPU

ПЦР амплификация
 Ручные операции: 30 мин
 Время цикла: 90 мин
 Реагенты
 Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)
 ПЦР полимеразы (PCR Polymerase)
 Праймеры индексированные (Index Primers)
 NaOH
 Результат
 Планшет AMP

Очистка продуктов ПЦР
 Ручные операции: 20 мин
 Процесс обработки: 30 мин
 Реагенты
 Буфер для элюции (Elution Buffer)
 Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads)
 EtOH
 Результат
 Планшет LNP

Нормализация библиотек
 Ручные операции: 30 мин
 Процесс обработки: 50 мин
 Реагенты
 Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)
 Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)
 Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)
 Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)
 NaOH
 Результат
 Планшет SGP

Объединение библиотек
 Ручные операции: 10 мин
 Реагенты
 Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)
 Результат
 Пробирки PAL и DAL



Оценка качества ДНК образцов FFPE

На этой стадии будет проведена количественная реакция ПЦР для определения амплифицируемости гДНК, выделенной из образцов FFPE. Путем сравнения амплифицируемости ДНК из образцов FFPE и образца контроля качества - гДНК, полученной не из FFPE, для каждого исследуемого образца может быть рассчитано значение ΔC_q , которое и используется для оценки качества ДНК и ее пригодности в исследованиях с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Количество вносимой ДНК меняется в зависимости от ее качества.

Расчетное время

- Общая продолжительность: 3 часа
- Ручные операции: 60 мин

Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	4 пробирки	-25 °C -- 15 °C	«Иллюмина» б	
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)	1 пробирка	-25 °C -- 15 °C	«Иллюмина» б	
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	2 пробирки	-25 °C -- 15 °C	«Иллюмина» б	
Геномная ДНК	По мере необходимости	-25 °C -- 15 °C	Пользователь—	
Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз	По мере необходимости	15 °C -- 30 °C	Пользователь—	
96-луночный или 384-луночный оптический планшет и пленка для ПЦР	1 планшет	15 °C -- 30 °C	Пользователь—	
Стрипы на восемь пробирок для ПЦР	По мере необходимости	15 °C -- 30 °C	Пользователь—	
Центрифужные микропробирки	По мере необходимости	15 °C -- 30 °C	Пользователь—	

Процедура

- 1 Извлеките ДНК контрольную для проверки качества (QC Template), праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers), смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix) и геномную ДНК из места хранения при температуре от -25 °C до -15 °C и размораживайте при комнатной температуре в течение 30 минут.
- 2 Поместите размороженные пробирки на лед.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если используете ДНК контрольную для проверки качества (QC Template) в первый раз, для долгосрочного хранения аликвотируйте ее по 7 мкл в стрипы для ПЦР,

чтобы избежать многократного размораживания-оттаивания



- 1 Определите схему нанесения в лунки планшета для реакции количественной ПЦР.

Для 10 исследуемых образцов компания «Иллюмина» рекомендует схему, представленную на рисунке 2 для 384-луночного формата. Аналогичную схему можно адаптировать для 96-луночного формата. Тестирование ДНК контрольной для проверки качества (QC Template), NTC и каждого исследуемого образца проводят в **трех повторностях**.

Предполагаемая схема нанесения 10 образцов в лунки планшета

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C		1	1	1		7	7	7																
D																								
E		2	2	2		8	8	8																
F																								
G		3	3	3		9	9	9																
H																								
I		4	4	4		10	10	10																
J																								
K		5	5	5		QCT	QCT	QCT																
L																								
M		6	6	6		NTC	NTC	NTC																
N																								
O																								
P																								

QCT = ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)

NTC = Контроль без матрицы (No Template Control)

- 2 Добавьте 5 мкл образца ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) к 495 мкл свободной от РНКаз/ДНКаз воды в центрифужной микропробирке.
- 3 Перемешайте разведенный образец на вортексе.
- 4 Добавьте 1,5 мкл выделенной геномной ДНК к 148,5 мкл свободной от РНКаз/ДНКаз воды в стрипе на восемь пробирок для получения 100-кратного разведения.



ПРИМЕЧАНИЕ

Компания «Иллюмина» рекомендует выполнять разведения в стрипе на восемь пробирок для ПЦР, чтобы сделать легче процесс переноса реагентов с помощью многоканальной пипетки.

- 5 Перемешайте разведения пипеткой P200 (вверх и вниз 10 раз).
- 6 Добавьте 150 мкл разведенного образца ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) в неиспользованную пробирку стрипа на восемь пробирок в соответствии со схемой нанесения в лунки планшета.
- 7 В другую неиспользованную пробирку добавьте 150 мкл воды свободной от РНКаз/ДНКаз для использования в качестве образца контроль без матрицы (NTC).
- 8 Приготовьте смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix) в соответствии с таблицей 11 (384-луночный формат) или таблицей 12 (96-луночный формат).

Смесь содержит дополнительный объем.

Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix) (384-луночный формат)

Расходные материалы	мкл на лунку	мкл на 36 реакций
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	5,0 мкл	205 мкл
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	0,8 мкл	33 мкл
Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз	2,2 мкл	90 мкл

Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix) (96-луночный формат)

Расходные материалы	мкл на лунку	мкл на 36 реакций
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	10,0 мкл	410 мкл
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	1,6 мкл	66 мкл
Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз	4,4 мкл	180 мкл

- 9 Тщательно, но осторожно перемешайте реакцию смесь.
- 10 До использования поместите реакцию смесь в защищенное от света место.
- 11 Чтобы было удобнее перемешивать многоканальной пипеткой, отберите аликвоту смеси в лоток или стрип на восемь пробирок.
- 12 Добавьте 8 мкл (384-луночный формат) или 16 мкл (96-луночный формат) смеси в каждую лунку планшета для количественной ПЦР. Внимательно следите за точным переносом в лунки, поскольку незначительные изменения повлияют на результаты анализа.
- 13 Добавьте в каждую лунку планшета 2 мкл (384-луночный формат) или 4 мкл (96-луночный формат) разведенной ДНК контрольной для проверки качества (QC Template), разведенных исследуемых образцов или воды, свободной от РНКаз/ДНКаз. Внимательно следите за точным переносом в лунки, поскольку незначительные изменения повлияют на результаты анализа.
- 14 Запечатайте планшет подходящей пленкой для прибора, стараясь избежать перекрестной контаминации и попадания на поверхность крышек. Убедитесь, что пленка наклеена правильно и планшет запечатан равномерно.
- 15 При необходимости поместите планшет в адаптер и центрифугируйте планшет при $1000 \times g$ в течение 1 минуты.
- 16 Убедитесь, что пленка не содержит какой-либо жидкости или пыли, поместите планшет в прибор для количественной ПЦР в правильной ориентации, затем закройте крышку и проводите количественную ПЦР в соответствии со следующим температурным профилем:
 - «Горячий» старт
 - 50 °C в течение 2 минут
 - 95 °C в течение 10 минут
 - x40
 - 95 °C в течение 30 секунд
 - 57 °C в течение 30 секунд
 - 72 °C в течение 30 секунд
 - Подтвердите, что прибор фиксирует изображения после стадии 72 °C.



ПРИМЕЧАНИЕ

Во избежание ошибки измерений из-за фона, пороговое значение C_q следует настроить так, чтобы оно подходило для используемого прибора.

17

После последнего этапа термоциклер выполняет анализ образцов. Убедитесь, что графики амплификации ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) соответствуют ожидаемым (см. кривые амплификации зеленого цвета на рисунке 3). В большинстве систем C_q амплификации образца ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) соответствует приблизительно 15–22 циклам. Исключите из группы трех повторностей те, которые отличаются от основной группы на $>0,5 C_q$. Две из трех повторностей $\leq 0,5 C_q$ должны быть включены в окончательные вычисления. Если эти критерии качества не выполнены, для таких образцов следует повторить процесс оценки качества.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если 4 или более на 10 образцов из постановки имеют исключенные повторности, это указывает на технические ошибки, поэтому процесс оценки качества следует повторить для всех образцов.



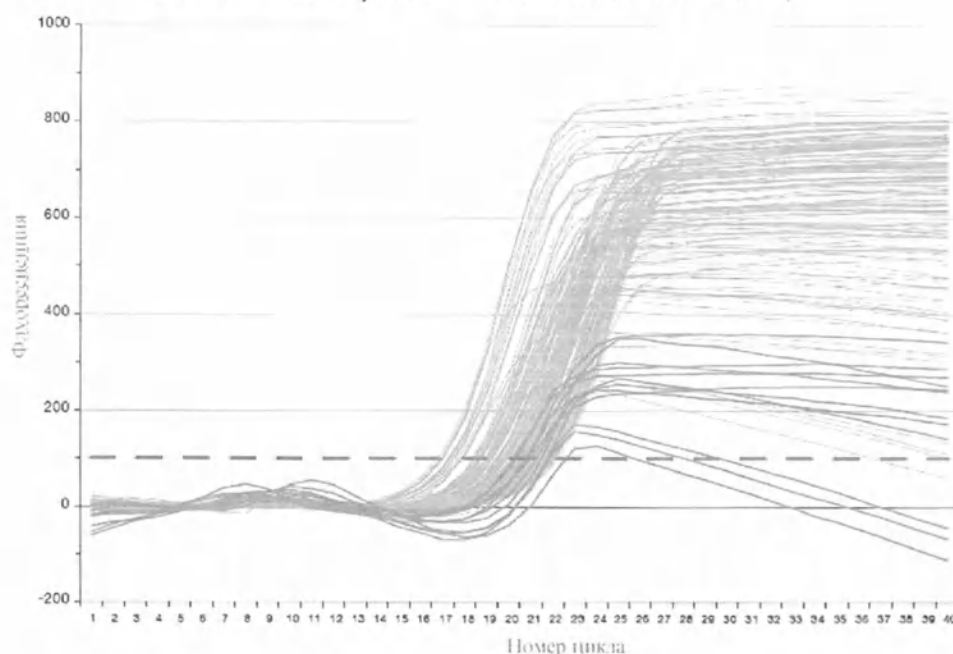
ПРИМЕЧАНИЕ

Если амплификация двух или более повторностей не происходит, для таких образцов следует повторить процесс оценки качества.

18

Повторности, для которых кривые амплификации отличаются от ожидаемых, следует исключить (см. кривые амплификации синего цвета на рисунке 3).

Оценка качества образцов* методом количественной ПЦР



* Оценку качества образцов ДНК, как показано на рисунке 3, для использования в создании библиотек для секвенирования следующего поколения, проводили методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием указанных в тексте параметров. На графике показаны кривые амплификации количественной ПЦР, полученные для этих образцов.

Фиолетовая линия — пороговая линия C_q

Кривые синего цвета — повторности ДНК с отклонением профилей амплификации, которые должны быть исключены из расчетов dC_q

Кривые зеленого цвета — повторности ДНК с ожидаемыми кривыми амплификации,

которые можно использовать для расчетов дельта Cq

- 19 Среднее значение Cq ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) вычитают из среднего значения Cq каждого образца (среднее значение Cq образца – среднее значение Cq ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) для получения значений дельта-Cq для каждого образца. Записывают значения дельта-Cq и коэффициенты разведения образца. Коэффициенты разведения образца определяют на основании рекомендаций в таблице 16.

- 20 Убедитесь, что амплификация NTC происходит по меньшей мере через 10 циклов после амплификации матрицы для КК.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если NTC не проходит, повторите весь процесс оценки качества для всех образцов.

Примеры расчетов dCq

Пример №	Повторность 1	Повторность 2	Повторность 3	Конечные значения включенные в расчеты Cq	Среднее значение Cq	dCq*
1	24,80	25,11	25,06	Все	24,99	6,87
Действия:	Не соответствует требованию к dCq (≤5,00). Образец не соответствует требованиям качества для анализа.					
2	17,22	18,58	17,91	Нет	Н/П	Н/П
Действия:	Исключите повторности с >0,5 Cq разницей от остальных трех повторностей. Процесс оценки качества образца необходимо повторить, поскольку требуется как минимум две действительные повторности.					
3	22,45	22,63	23,52	22,45 и 22,63	22,54	4,42
Действия:	Исключите повторности с отлиием >0,5 Cq от остальных трех повторностей. Рассчитайте dCq с использованием значений для двух действительных повторностей. Требование к dCq выполнено (≤5,00).					
4	21,56	21,73	21,48	Все	21,59	3,46
Действия:	Образцы соответствуют требованиям качества, где значения трех повторностей не отличаются на >0,5 Cq. Требование к dCq выполнено (≤5,00).					
5	18,21	18,50	19,04	Все	18,70	0,58
Действия:	Образцы соответствуют требованиям качества, где значения трех повторностей не отличаются на >0,5 Cq. Требование к dCq выполнено (≤5,00).					
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) (пример 1)	17,86	18,11	18,40	Все	18,12	0
Действия:	ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) соответствует требованиям качества, где значения трех повторностей не отличаются на >0,5 Cq. ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) прошла контроль качества (среднее значение Cq ≥15 и ≤22).					
Контрольные расчеты						
NTC (отрицательный	26,00	25,64	25,83	Все	25,82	7,7

контроль)

Действие: Все образцы не соответствуют требованиям качества. Амплификация NTC должна происходить через ≥ 10 циклов после амплификации ДНК контрольной для проверки качества (QC Template). Повторите процесс оценки качества для всех образцов, ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) и NTC.

ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) (пример 2)	9,85	9,73	9,87	Все	9,82	0
--	------	------	------	-----	------	---

Действие: ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) не соответствует требованиям. Среднее значение C_q должно быть ≥ 15 и ≤ 22 . Повторите процесс оценки качества для всех образцов, ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) и NTC.

* dC_q рассчитывают по формуле [среднее значение C_q образца - среднее значение C_q ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) (пример 1)]

ГОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОС ТАПОВКИ

Компания «Иллюмина» рекомендует хранить выделенную геномную ДНК при температуре от 2 °С до 8 °С в течение максимум 28 суток или хранить ее в замороженном виде при температуре от -15 °С до -25 °С в течение максимум 161 суток. Геномная ДНК, хранившаяся в замороженном виде, стабильна максимум 2 цикла замораживания и оттаивания.

Настройка параметров

- 1 Введите имя пользователя и пароль в программу Local Run Manager.
- 2 Нажмите на указателе «**Create Run**» (**Создать прогон**) и выберите «**Extended RAS**» (Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel).
- 3 Убедитесь, что в верхнем левом углу экрана появилась надпись «Create Run Praxis Extended RAS» (Создать прогон для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel).
- 4 Введите название, позволяющее идентифицировать прогон среди данных анализа высокопроизводительного секвенирования. Используйте буквы алфавита, пробелы, подчеркнутые пробелы или тире.
- 5 [Необязательно] Введите описание прогона, помогающее идентифицировать прогон. Используйте буквы алфавита.

Укажите образцы для прогона, используя следующие опции:

- * **Ввод образцов вручную** — используйте таблицу на экране «Создать прогон».
- **Импортирование образцов** — перейдите во внешний файл в формате значений, разделенных запятой (*.csv).

После заполнения таблицы образцов информацию об образцах можно экспортировать во внешний файл и импортировать этот файл для другого прогона.

- 1 Нажмите на область A1 или E7 для ввода информации об образцах. Область A1 соответствует верхнему левому квадранту лунок схемы планшета для гибридизации (Hyb) и включает образцы для пулов олигонуклеотидов A и B. Область E7 соответствует нижнему правому квадранту схемы планшета для гибридизации (Hyb) и включает образцы для пулов олигонуклеотидов A и B.
- 2 Для каждой используемой лунки вводите уникальное название образца в поле «Sample Name» (Название образца) в таблице пула A. Используйте буквы алфавита, тире или подчеркнутые пробелы. Название образца автоматически включается в соответствующую лунку в таблице пула B. При вводе названия образца на экране появляются двойные адаптеры для каждого индексного прочтения (Index Read) определенной лунки.
- 3 [Необязательно] Хотя рекомендуется схема по умолчанию, используйте выпадающее меню «Positive Control» (Положительный контроль) или «Negative Control» (Отрицательный контроль), чтобы изменить положение контрольных образцов.
- 4 Для отображения схемы планшета нажмите кнопку мыши на пиктограмме  печати.
- 5 Выберите «Print» (Печать), чтобы распечатать схему планшета для приготовления библиотек.
- 6 Нажмите на «Close» (Заккрыть).
- 7 Нажмите на «Save Run» (Сохранить прогон).

Импортирование образцов

- 1 Нажмите на область A1 или E7.

- 2 Для вывода примера нажмите пиктограмму «Export» (Экспорт) .
- 3 Введите уникальное название образца в форме, содержащей до 10 образцов, и сохраните файл. Используйте буквы алфавита, тире или подчеркнутые пробелы.

[Data] (Данные)]	[Sample Names as a 4*3 matrix] (Название образцов в виде 4 * 3)	
Образец 1	Образец 5	Образец 9
Образец 2	Образец 6	Образец 10
Образец 3	Образец 7	Положительный_контроль
Образец 4	Образец 8	Отрицательный_контроль

- 4 Нажмите команду «Import Samples» (Импортировать образцы).
- 5 Перейдите в место расположения файла с информацией об образце в формате *.csv.
- 6 После окончания работы для отображения схемы планшета нажмите на пиктограмме  печати.
- 7 Выберите «Print» (Печать), чтобы распечатать схему планшета для приготовления библиотек.
- 8 Нажмите «Close» (Заккрыть).
- 9 Нажмите «Save Run» (Сохранить прогон).

Последовательности праймеров индексированных A-H (A501-A508)

Индексированный праймер	Последовательность
Праймер индексированный A (A501)	TGAACCTT
Праймер индексированный B (A502)	TGCTAAGT
Праймер индексированный C (A503)	TGTTCTCT
Праймер индексированный D (A504)	TAAGACAC
Праймер индексированный E (A505)	CTAATCGA
Праймер индексированный F (A506)	CTAGAACA
Праймер индексированный G (A507)	TAAGTTCC
Праймер индексированный H (A508)	TAGACCTA

Последовательности праймеров индексированных 1-12 (A701-A712)

Индексированный праймер	Последовательность
Праймер индексированный 1 (A701)	ATCACGAC

Праймер индексированный 2 (A702)	ACAGTGGT
Праймер индексированный 3 (A703)	CAGATCCA
Праймер индексированный 4 (A704)	ACAAACGG
Праймер индексированный 5 (A705)	ACCCAGCA
Праймер индексированный 6 (A706)	AACCCCTC
Праймер индексированный 7 (A707)	CCCAACCT
Праймер индексированный 8 (A708)	CACCACAC
Праймер индексированный 9 (A709)	GAAACCCA
Праймер индексированный 10 (A710)	TGTGACCA
Праймер индексированный 11 (A711)	AGGGTCAA
Праймер индексированный 12 (A712)	AGGAGTGG

Гибридизация пула праймеров

На этой стадии пулы праймеров из набора реагентов Praxis Extended RAS Panel, специфичные к генам RAS гибридизуются с образцами геномной ДНК.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может быть причинен в результате вдыхания, проглатывания, попадания на кожу и попадания в глаза. Во избежание риска воздействия, используйте средства защиты, в том числе средства защиты глаз, перчатки и лабораторный халат. С использованными реагентами обращаются как с химическими отходами и утилизируют их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и нормативами. Дополнительные сведения о защите окружающей среды и безопасности см. паспорта безопасности на сайте support.illumina.com/sds.html.

ПРИМЕЧАНИЕ

Illumina не поддерживает использование образцов гДНК с величиной дельта-Cq более 5,00 для подготовки библиотек с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Расчетное время

Общая продолжительность: 3–18 часов (в течение ночи)

Ручные операции: 15 мин

Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	6
Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	6
Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1A
Геномная ДНК	20 мкл	-25 °C – -15 °C	Пользователь	—
Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	6
Буфер TE	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
96-луночный планшет для ПЦР с юбкой	1 планшет	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Пленка для запечатывания микропланшетов или Алюминиевая фольга	2 пленки	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Стерильные лотки	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—

- 1 Определите образцы геномной ДНК, которые будут использоваться для исследования. Образцы, позволяющие получить величину дельта-Сq $\leq 5,00$, можно использовать для процесса подготовки библиотек с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.
- 2 [Необязательно] Если образцы выделенной ДНК не соответствуют пороговой величине дельта-Сq, для выделения ДНК можно использовать дополнительные срезы ткани при их наличии.
- 3 Извлеките пул праймеров А (Oligo Pool A – Extended RAS), пул праймеров В (Oligo Pool B – Extended RAS), буфер для гибридизации (Hybridization Buffer), образцы геномной ДНК и библиотеку контрольную RAS (Panel Control – Extended RAS) из места хранения при температуре $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и разморозьте при комнатной температуре.
- 4 Тщательно перемешайте пул праймеров А (Oligo Pool A – Extended RAS), пул праймеров В (Oligo Pool B – Extended RAS) и буфер для гибридизации (Hybridization Buffer), на вортксе, чтобы убедиться, что все осадки растворились, затем кратковременно центрифугируйте для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ

Перед использованием буфера для гибридизации (Hybridization Buffer) визуально оцените пробирку в вертикальном положении перед источником освещения, чтобы убедиться, что все осадки полностью растворились.

- 5 Установите температуру 96-луночного термоблока на $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6 Для подготовки к стадии элонгации-лигирования предварительно нагрейте термостат до $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7 Создайте прогон и введите информацию об образцах на планшете в модуль анализа набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Проверьте расположение положительного и отрицательного контроля, а затем распечатайте схему расположения образцов на планшете. Компания «Иллюмина» рекомендует проводить обработку образцов сериями, включающими не более 12 образцов/24 библиотеки.

ПРИМЕЧАНИЕ

При использовании контрольных образцов служба технической поддержки компании «Иллюмина» гарантирует предоставление эффективного технического сопровождения по устранению проблем. Служба технической поддержки компании «Иллюмина» не сможет обеспечить техническое сопровождение, если в прогон не были включены контрольные реакции.

- 1 Промаркируйте новый 96-луночный планшет для ПЦР **HYB_Plate_ID**. Предложенную схему внесения образцов в лунки планшета **HYB** для следующих стадий см. на рисунке 4.

Рисунок 4. Схема планшета НУВ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Образец 1	Образец 5	Образец 9	Образец 1	Образец 5	Образец 9						
B	Образец 2	Образец 6	Образец 10	Образец 2	Образец 6	Образец 10						
C	Образец 3	Образец 7	Положительный контроль	Образец 3	Образец 7	Положительный контроль						
D	Образец 4	Образец 8	Отрицательный контроль	Образец 4	Образец 8	Отрицательный контроль						
E							Образец 11	Образец 15	Образец 19	Образец 11	Образец 15	Образец 19
F							Образец 12	Образец 16	Образец 20	Образец 12	Образец 16	Образец 20
G							Образец 13	Образец 17	Положительный контроль	Образец 13	Образец 17	Положительный контроль
H							Образец 14	Образец 18	Отрицательный контроль	Образец 14	Образец 18	Отрицательный контроль

Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)

Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)

- Используя схему внесения образцов, показанную на рисунке 4, добавьте 10 мкл буфера TE в лунки, обозначенные как отрицательный контроль (NTC) для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS).
- Для каждой библиотеки на 12 образцов/24 библиотеки добавьте 2,5 мкл библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS) к 22,5 мкл буфера TE в центрифужной микропробирке. Тщательно перемешайте разведенный образец библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS).
- Используя схему внесения образцов в лунки планшета, показанную на рисунке 4, добавьте 10 мкл разведенного образца библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS), из пункта 3 в каждую из двух лунок, обозначенных как положительный контроль для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS).
- Определите, требуется ли разведение образцов, на основании таблицы 16. При необходимости в разведении 15 мкл геномной ДНК, выделенной из образцов FFPE, разведите буфером TE в соответствии с таблицей 16. Например, для образца с дельта Cq -1,50 добавьте 15 мкл образца к 15 мкл буфера TE. Для образца с дельта Cq -2,50 добавьте 15 мкл образца к 45 мкл буфера TE.

Дельта-Cq таблица разведений

Дельта Cq	<-1,51	от -1,50 до -0,51	от -0,50 до 0,50	от 0,51 до 1,50	от 1,51 до 5,00	>5,00
Разведение	4-кратное	2-кратное	Без разведения	Без разведения	Без разведения	Не поддерживается

- Используя схему внесения образцов в лунки планшета, показанную на рисунке 4, добавьте 10 мкл каждого образца геномной ДНК, приготовленного на стадии 5, в лунки с

пулом праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) планшета **НУВ**, начиная с колонок 1 или 7. Повторите этот процесс для лунок с пулом праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) планшета **НУВ**, начиная с колонок 4 или 10.



ПРИМЕЧАНИЕ

Проверьте, чтобы схема внесения образцов ДНК в лунки планшета и положения положительного и отрицательного контрольных образцов соответствовали схеме внесения образцов в лунки планшета, показанной на рисунке 4.

7

С помощью многоканальной пипетки добавьте по 5 мкл пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) во все лунки, содержащие геномную ДНК, библиотеку контрольную RAS (Panel Control – Extended RAS) и отрицательный контрольный образец, предназначенные для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS), в колонках 1-3 или 7-9 планшета **НУВ**. С помощью многоканальной пипетки добавьте по 5 мкл пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) во все лунки, содержащие геномную ДНК, библиотеку контрольную RAS (Panel Control – Extended RAS) и отрицательный контрольный образец, предназначенные для пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS), в колонках 4-6 или 10-12 планшета **НУВ**. Во избежание перекрестной контаминации меняйте наконечники после каждой колонки.

8

С помощью многоканальной пипетки добавьте к каждому образцу в планшете **НУВ** по 40 мкл буфера для гибридизации (Hybridization Buffer). Перемешайте смесь пипеткой (вверх и вниз 3–5 раз). Во избежание перекрестной контаминации меняйте наконечники после каждой колонки.



ПРИМЕЧАНИЕ

Убедитесь, что все кристаллы или осадок в буфере для гибридизации (Hybridization Buffer) растворились.



ПРИМЕЧАНИЕ

Не смешивайте пулы праймеров и буфер для гибридизации (Hybridization Buffer) для хранения. При объединении пулы праймеров утрачивают стабильность даже при хранении в замороженном виде.

9

Запечататайте планшет **НУВ** с помощью пленки для микропланшетов. При отсутствии пленки для запечатывания микропланшетов используйте алюминиевую фольгу и валик или другой инструмент для запечатывания, особенно тщательно запечатайте по периметру планшета.

10

Центрифугируйте при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты.

11

Поместите планшет **НУВ** в предварительно нагретый блок при 95 °C и инкубируйте в течение 1 минуты.

12

Измените температуру в том же термоблоке на 40 °C и инкубируйте в течение 3–18 часов.



ПРИМЕЧАНИЕ

Перемещение планшета из термоблока на 95 °C в другой предварительно нагретый термоблок, установленный на 40 °C, окажет отрицательное влияние на результаты гибридизации.

Удаление несвязавшихся праймеров

Эта процедура позволит удалить несвязавшиеся праймеры из раствора геномной ДНК с помощью фильтровального планшета, на котором происходит отбор по размеру последовательности. Две стадии отмывки буфером для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer) обеспечивают полное удаление несвязавшихся праймеров. Третья стадия промывки буфером универсальным, промывочным (Universal Wash Buffer) позволяет удалить оставшийся буфер для интенсивной промывки (Stringent Wash Buffer) и подготовить образцы к стадии элонгации-лигирования.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может быть причинен в результате вдыхания, проглатывания, попадания на кожу и попадания в глаза. Во избежание риска воздействия используйте средства защиты, в том числе средства защиты глаз, перчатки и лабораторный халат. С использованными реагентами обращаются как с химическими отходами и утилизируют их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и нормативами. Дополнительные сведения о защите окружающей среды и безопасности см. паспорта безопасности на сайте support.illumina.com/sds.html.

Расчетное время

Общая продолжительность: 25 минут

Ручные операции: 25 мин

Расходные материалы

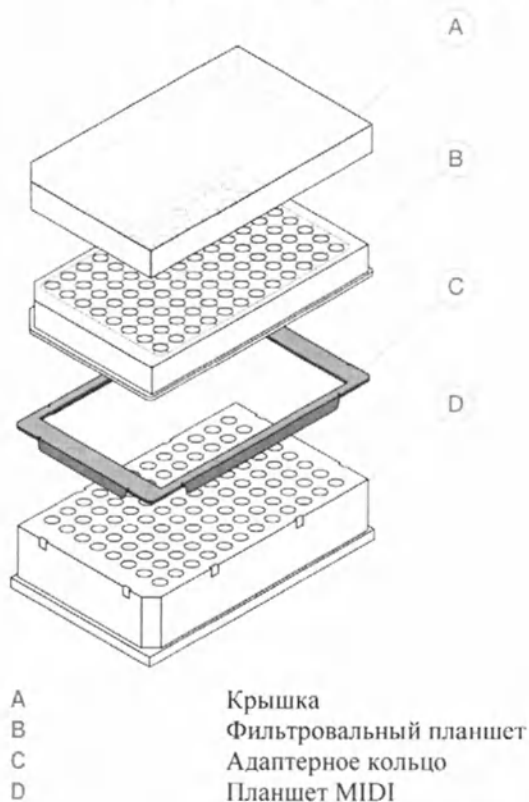
Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1А
Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)	1 флакон	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	3А
Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)	1 пробирка	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	3А
Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)	1 планшет	15 °C – 30 °C	«Иллюмина»	5
Адаптерное кольцо	1 планшет	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Планшет MIDI	1 планшет	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Лотки	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—

Шаг 1. Извлечение

- 1 Извлеките смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix) из места хранения при температуре -25 °C до -15 °C и разморозьте при комнатной температуре.

- 2 Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix) используют на стадии элонгации-лигирования, и ее размораживание занимает приблизительно 20 минут.
- 3 Извлеките буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer) и буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer) из места хранения при температуре от 2 °C до 8 °C и оставьте при комнатной температуре.
- 4 Соберите устройство для фильтрования на планшете (FPU) в следующем порядке (снизу вверх):

Устройство для фильтрования на планшете



- 5 Промаркируйте планшет фильтровальный **FPU_Plate_ID**.
- 6 Выполните предварительную промывку мембраны планшета фильтровального, как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку по 50 мкл буфера для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)
 - b Закройте планшет **FPU** крышкой фильтровального планшета и держите ее закрытой в течение всей стадии центрифугирования.
 - c Центрифугируйте планшет **FPU** при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.
 - d Если промывочный буфер слит не полностью, еще раз центрифугируйте при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ

Компания «Иллюмина» настоятельно рекомендует иметь запасные планшеты фильтровальные (FC-130-1006) в качестве общелабораторных расходных материалов.

- 1 После инкубации для гибридизации убедитесь, что термоблок охладился до 40 °C.
 **ПРИМЕЧАНИЕ**
Если за ночь термоблок не охладился до 40 °C, необходимо будет повторить приготовление библиотеки.
- 2 Извлеките планшет **НУВ** из термоблока и центрифугируйте при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы собрать конденсат.
- 3 С помощью многоканальной пипетки, установленной на 65 мкл, перенесите весь объем каждого образца в центр соответствующих предварительно промытых лунок планшета фильтровального. Во избежание перекрестной контаминации меняйте наконечники после каждой колонки.
- 4 Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при 2400 × g при комнатной температуре в течение 5 минут.
 **ПРИМЕЧАНИЕ**
Убедитесь, что жидкость после центрифугирования полностью слита. При необходимости повторите центрифугирование.
- 5 Выполните промывку планшета фильтровального, как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку с образцом по 50 мкл буфера для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer). При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.
 - b Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при 2400 × g при комнатной температуре в течение 5 минут.
 - c Если промывочный буфер слит не полностью, еще раз центрифугируйте фильтровальный планшет при 2400 × g при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6 Повторите промывание, как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку с образцом по 50 мкл буфера для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer).. При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.
 - b Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при 2400 × g при комнатной температуре в течение 5 минут.
 - c Если промывочный буфер слит не полностью, еще раз центрифугируйте планшет при 2400 × g при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 7 Удалите весь собранный к этому моменту фильтрат, содержащий формамид, в соответствующий контейнер для опасных отходов, затем повторно соберите **FPU**. Тот же планшет **MIDI** можно использовать повторно для остального процесса подготовки к амплификации.
- 8 С помощью многоканальной пипетки добавьте в каждую лунку с образцом по 45 мкл буфера универсального, промывочного (Universal Wash Buffer). При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.
- 9 Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при 2400 × g при комнатной температуре в течение 5 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ.

Убедитесь, что жидкость после центрифугирования полностью слита. При необходимости повторите центрифугирование. Оставшийся промывочный буфер может ингибировать последующие ферментативные реакции.

Удлинения-лигирование связанных праймеров

В результате этой реакции происходит связывание гибридизовавшихся праймеров из пары, которые расположены выше и ниже по последовательности целевого региона. ДНК-полимераза осуществляет достройку от праймера, расположенного выше по последовательности, с последующим лигированием с 5'-концом праймера, расположенного ниже по последовательности целевого региона, с помощью ДНК-лигазы. В результате образуются продукты, содержащие представляющие интерес целевые области.

Расчетное время

- * Общая продолжительность: 50 минут
- * Ручные операции: 5 мин

Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1А
Клеящаяся алюминиевая фольга	1 штука	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Лотки	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—

- 1 С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку фильтровального планшета, содержащую исследуемый образец, по 45 мкл смеси для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix). Реакция удлинения-лигирования проходит на мембране фильтровального планшета. При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.
- 2 Запечатайте фильтровальный планшет клеящейся алюминиевой фольгой, а затем закройте крышкой, чтобы закрепить фольгу во время инкубации.
- 3 Инкубируйте все устройство FPU в подогретом до 37 °C термостате в течение 45 минут.
- 4 Во время инкубации планшета FPU подготовьте планшет для амплификации АМР, как описано в следующем разделе.

ПЦР-амплификация

На этой стадии происходит амплификация продуктов удлинения-лигирования с использованием праймеров, которые присоединяют индексные последовательности для мультиплексирования образцов, а также общие адаптеры, необходимые для образования кластеров.

Расчетное время

Общая продолжительность: ~105 минут

Ручные операции: 30 мин

Расходные материалы

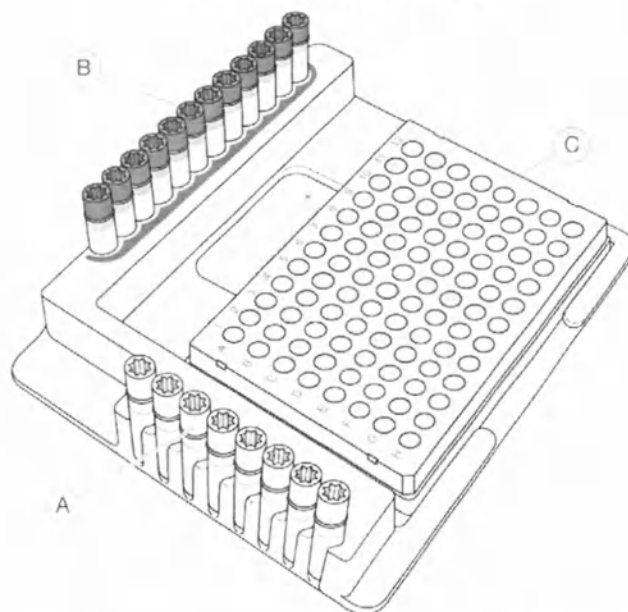
Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1A
Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508))	1 пробирка для каждого праймера	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1A
Праймеры индексированные I (A701) – 12 (A712) (Index Primers I (A701) – 12 (A712))	1 пробирка для каждого праймера	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1A
ПЦР полимеразы (PCR Polymerase)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1A
Пленка для ПЦР-планшетов	1	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
0,05 N свежеприготовленный раствор NaOH	5 мл	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
96-луночный планшет для ПЦР с юбкой	1 планшет	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Лотки	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—

Процедура

- 1 Приготовьте свежий 0,05 N раствор NaOH, добавляя 25 мкл 10 N NaOH к 4975 мкл стерильной воды.
- 2 Определите праймеры индексированные для использования в соответствии с графической схемой планшета, построенной модулем анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.
- 3 Извлеките смесь для ПЦР (PCR Master Mix) и соответствующие праймеры индексированные из места хранения при температуре -25 °C до -15 °C и разморозьте на столе при комнатной температуре. Оставьте реагенты для размораживания приблизительно на 20 минут.

- 4 После того, как праймеры индексированные полностью разморозятся, перемешайте содержимое каждой пробирки на вортексе, а затем кратковременно отцентрифугируйте пробирки в микроцентрифуге. В качестве адаптеров для микроцентрифуги используйте центрифужные микропробирки емкостью 1,7 мл.
- 5 Расположите праймеры в штативе по следующей схеме:
 - а Расположите пробирки с праймерами индексированными А (A501) – Н (A508) (Index Primers A (A501) – Н (A508) (белые крышки, прозрачный раствор) в вертикальном направлении, выравнивая с рядами А–Н.
 - б Расположите пробирки с праймерами индексированными 1 (A701) – 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712) (оранжевые крышки, желтый раствор) в горизонтальном направлении, выравнивая с колонками 1-12.

Фиксация индексного планшета



А Праймеры индексированные А (A501) – Н (A508) (Index Primers А (A501) – Н (A508) (белые крышки)

В Праймеры индексированные 1 (A701) – 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712) (оранжевые крышки)

С планшет AMP

- 6 Промаркируйте новый 96-луночный планшет для ПЦР AMP (планшет для амплификации).
- 7 Внесите праймеры индексированные в лунки планшета AMP следующим образом:
 - а С помощью многоканальной пипетки добавьте по 9 мкл выбранных праймеров индексированных А (A501) – Н (A508) (Index Primers А (A501) – Н (A508) (прозрачный раствор) в соответствующие лунки колонки планшета AMP.
 - б С помощью многоканальной пипетки добавьте по 9 мкл выбранных праймеров индексированных 1 (A701) – 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712) (желтый раствор) в соответствующий ряд планшета AMP. *Во избежание перекрестной контаминации праймеров индексированных необходимо менять наконечники после каждого ряда.*
 - в Удалите все пробирки с праймерами индексированными из рабочей зоны.



ПРИМЕЧАНИЕ

Праймеры индексируемые предназначены только для однократного использования и должны быть сразу уничтожены после использования.

- 8 Приготовьте рабочий раствор для ПЦР смесь для ПЦР (PCR Master Mix) / ПЦР полимеразы (PCR Polymerase), как описано ниже:

- а Для 12 образцов/24 библиотек добавьте 21 мкл ПЦР полимеразы (PCR Polymerase) к 1050 мкл смеси для ПЦР (PCR Master Mix).
б Переверните приготовленный рабочий раствор для ПЦР 20 раз, чтобы перемешать.

На следующей стадии этот рабочий раствор вносят в планшет **AMP**. Рабочий раствор для ПЦР стабилен при комнатной температуре в течение 10 минут, а также при необходимости может храниться на льду во время приготовления.



ПРИМЕЧАНИЕ

ПЦР полимеразу (PCR Polymerase) всегда добавляйте в смесь для ПЦР (PCR Master Mix) непосредственно перед использованием. Не храните объединенный рабочий раствор для ПЦР.

- 1 После завершения реакции удлинения-лигирования извлеките **FPU** из термостата. Снимите пленку из алюминиевой фольги и верните на место крышку фильтровального планшета.

Снятие алюминиевой фольги перед центрифугированием обеспечивает эффективное прохождение супернатанта реакционной смеси через фильтр в планшет для отходов.

- 2 Центрифугируйте планшет **FPU** при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 2 минут.

- 3 С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку планшета фильтровального, содержащую исследуемый образец, по 25 мкл 0,05 N NaOH. Убедившись, что наконечники пипетки коснулись мембраны, перемешайте щелочь пипеткой (вверх и вниз 5–6 раз). Необходимо менять наконечники после каждой колонки.

- 4 Накройте и инкубируйте планшет фильтровальный при комнатной температуре в течение 5 минут.

- 5 Во время инкубации планшета фильтровального перенесите с помощью многоканальной пипетки по 22 мкл рабочего раствора для ПЦР в каждую лунку планшета **AMP**, содержащего праймеры индексируемые. Меняйте наконечники после каждого образца.

- 6 Перенесите элюированные образцы из фильтра в планшет **AMP**, как описано ниже:

- а Установите многоканальную пипетку P20 на 20 мкл.
б Перемешайте образцы в первой колонке планшета фильтровального пипеткой (вверх и вниз 5–6 раз).



ПРИМЕЧАНИЕ

Слегка наклоните планшет **FPU**, чтобы полностью отобрать образец и избежать образования пузырьков воздуха.

- с Перенесите по 20 мкл из планшета фильтровального в соответствующую колонку планшета **AMP**.

- d Осторожно перемешайте пипеткой (5–6 раз вверх и вниз), чтобы тщательно перемешать ДНК с рабочим раствором для ПЦР.
 - e Аналогичным образом перенесите образцы из остальных колонок фильтровального планшета в планшет AMP. *Во избежание перекрестной контаминации праймеров индексируемых и исследуемых образцов необходимо менять наконечники после каждой колонки.*
 - f Как только все образцы перенесены, планшет MIDI с собранными отходами планшета FPU можно выбросить. Металлическое адаптерное кольцо можно промыть и оставить для дальнейшего использования.
- 7 Запечатайте планшет AMP подходящей пленкой для планшета с помощью ролика.
 - 8 Центрифугируйте при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 1 минуты.
 - 9 Перенесите планшет AMP в постаmplификационную зону.
 - 10 Проведите ПЦР, используя следующую программу на термоциклере:
 - » 95 °C в течение 3 минут
 - » 32 цикла:
 - » 95 °C в течение 30 секунд
 - » 66 °C в течение 30 секунд
 - » 72 °C в течение 60 секунд
 - » 72 °C в течение 5 минут
 - » Выдерживание при 10 °C



ПРИМЕЧАНИЕ

Компания «Иллюмина» настоятельно рекомендует использовать оптическую компрессионную прокладку, чтобы обеспечить надлежащую температуру между термоциклером для ПЦР и реакционными планшетами и предотвратить испарение образца.



ПРИМЕЧАНИЕ

Установите на приборе для ПЦР объем реакционной смеси на 60 мкл и скорость изменения температуры на максимальное значение.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

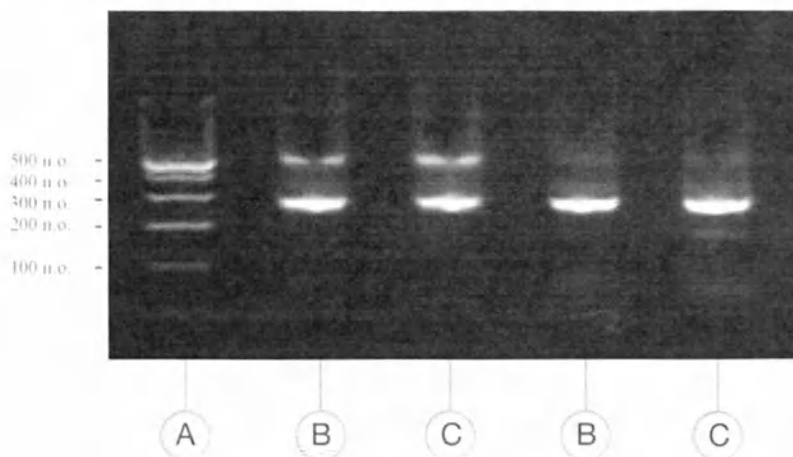
Если не переходить сразу к стадии очистки ПЦР, планшет AMP можно оставить на термоциклере на ночь или хранить при температуре от 2 °C до 8 °C вплоть до 48 суток.

Проверка полученной библиотеки

После ПЦР:

- 1 Смешайте 5 мкл продукта амплификации с 15 мкл воды, свободной от РНКаз/ДНКаз, и при необходимости с красителем для нанесения ДНК на гель.
- 2 Проведите электрофорез в 2-4% агарозном геле с маркером молекулярной массы 100 п. о., чтобы подтвердить наличие и яркость свечения продукта библиотеки размером 250-280 п. о.
 - Образцы, амплификация которых прошла с обоими пулами праймеров А и В, считают действительными, и можно переходить к остальным стадиям последовательности действий (рисунок 7).
 - Образцы, для которых амплификация с одним из пулов праймеров (рисунок 8, слева) или с обоими пулами праймеров (рисунок 8, справа) была незначительной или отсутствовала, считают недействительными, и остальные стадии последовательности действий проводить нельзя. В случае получения недействительного результата гель-электрофореза необходимо повторить стадию приготовления библиотеки для этого образца или образцов.
 - Результат гель-электрофореза отрицательного контрольного образца должен быть нулевым. Наличие продукта амплификации отрицательного контрольного образца с обоими пулами праймеров А и В свидетельствует о возможных ошибках при обработке, т. е. контаминации, ошибках при переносе или при составлении смесей исследуемых образцов. Оператор должен определить причину и при необходимости повторить процесс подготовки библиотек. В случае подозрения на контаминацию, процесс подготовки библиотеки следует повторить для всех образцов. При подозрении на ошибку при переносе или составлении смесей повторите процесс подготовки библиотеки для неполучившихся образцов.
 - Присутствие полосы 500 п. о. нормально и не влияет на производительность системы.

Пример хороших результатов гель-электрофореза



A Размерный стандарт 100 п.о.

B Пул праймеров А (Oligo Pool A – Extended RAS)

C Пул праймеров В (Oligo Pool B – Extended RAS)

А Размерный стандарт 100 п.о.
В Пул праймеров А (Oligo Pool A – Extended RAS)
С Пул праймеров В (Oligo Pool B – Extended RAS)

А Размерный стандарт 100 п.о.
В Пул праймеров А (Oligo Pool A – Extended RAS)
С Пул праймеров В (Oligo Pool B – Extended RAS)

Очистка ПЦР-продуктов

На этом этапе микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) используют для очистки от других компонентов реакционной смеси.

Расчетное время

Общая продолжительность: 50 минут

Ручные операции: 20 мин

Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Буфер для элюции (Elution Buffer)	1 пробирка	15 °C – 30 °C	«Иллюмина»	5
Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads)	1,8 мл на 12 образцов/24 библиотеки	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	3В
80%-ный свежеприготовленный раствор этанола	15 мл на 12 образцов/24 библиотеки	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
96-луночные планшеты MIDI	2	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Пленка для запечатывания планшета	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Лотки	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—



ПРИМЕЧАНИЕ

В начале выполнения этого протокола просмотрите раздел «Меры предосторожности», касающийся обращения с микрочастицами и промывки 80%-ным раствором этанола на стадии очистки продуктов ПЦР.

- 1 Доведите микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) до комнатной температуры.
- 2 Приготовьте свежий 80%-ный раствор этанола из абсолютного этанола. Для 12 образцов/24 библиотек приготовьте 80%-ный раствор этанола, используя 12 мл абсолютного этанола и 3 мл воды, свободной от ДНКаз/РНКаз. Тщательно перемешайте.



ПРИМЕЧАНИЕ

Для стадий промывки всегда готовьте свежий 80%-ный раствор этанола. Этанол может поглощать воду из воздуха, что влияет на результаты.

- 1 Центрифугируйте планшет AMP при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы собрать конденсат.
- 2 Промаркируйте новый планшет MIDI "CLP_Plate_ID" (планшет для очистки).

- 3 Переверните микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) 10 раз. Тщательно перемешайте их на вортексе, а затем снова переверните 10 раз.
- 4 Осмотрите раствор визуально, чтобы убедиться, что все микрочастицы хорошо ресуспендированы.
- 5 С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку планшета **CLP** по 55 мкл микрочастиц для очистки ПЦР-продуктов.(PCR Clean-Up Beads)
- 6 С помощью многоканальной пипетки, установленной на 60 мкл, перенесите весь продукт ПЦР из планшета **AMP** в планшет **CLP**. Меняйте наконечники после каждого образца.
- 7 Запечатайте планшет **CLP** клеящейся пленкой для планшетов.
- 8 Встряхивайте планшет **CLP** на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 2 минут.
- 9 Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре (15 °C — 30 °C) без встряхивания.
- 10 Поместите планшет на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор пока супернатант не станет прозрачным.
- 11 Пока планшет **CLP** находится на магнитном штативе, осторожно удалите супернатант многоканальной пипеткой, установленной на 100 мкл. Меняйте наконечники после каждого образца.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если какие-либо микрочастицы случайно захватились в наконечник, выпустите их обратно в планшет, оставьте планшет на магнитном штативе на 2 минуты и пока супернатант не станет светлым.



ПРИМЕЧАНИЕ

Задержки на этой стадии могут привести к слипанию микрочастиц после удаления супернатанта. Как только супернатант удален, как можно быстрее переходите к следующей стадии.

- 12 Пока планшет **CLP** находится на магнитном штативе, промойте микрочастицы свежеприготовленным 80%-ным раствором этанола, как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки добавьте в каждую лунку с исследуемым образцом 200 мкл свежеприготовленного 80%-ного раствора этанола. При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации менять наконечники не требуется. В этот момент нет необходимости ресуспендировать микрочастицы.
 - b Инкубируйте планшет на магнитном штативе в течение минимум 30 секунд или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
 - c Осторожно удалите супернатант.
- 13 Пока планшет **CLP** находится на магнитном штативе, выполните вторую промывку этанолом, как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку с исследуемым образцом 200 мкл свежеприготовленного 80%-ного раствора этанола.
 - b Инкубируйте планшет на магнитном штативе в течение минимум 30 секунд или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
 - c Осторожно удалите супернатант.

- 14 Для удаления избытка этанола используйте многоканальную пипетку P20, установленную на 20 мкл. Не взбалтывайте частицы и не касайтесь их.
- 15 Снимите планшет **CLP** с магнитного штатива и оставьте микрочастицы для подсушивания на воздухе в течение 5 минут.
- 16 С помощью многоканальной пипетки добавьте к каждому исследуемому образцу по 25 мкл буфера для элюции (Elution Buffer) . При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации менять наконечники не требуется.
- 17 Запечатайте планшет пленкой для планшетов.
- 18 Встряхивайте планшет **CLP** на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ:

Убедитесь, что все образцы полностью ресуспендированы. При наличии образцов, в которых микрочастицы не полностью ресуспендированы, осторожно перемешайте их вверх и вниз и повторите две предшествующие стадии.

- 19 Поместите планшет **CLP** на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
- 20 Промаркируйте новый планшет **MIDI LNP_Plate_ID** (планшет для нормализации библиотеки).
- 21 С помощью многоканальной пипетки P20 и тонких наконечников перенесите по 20 мкл супернатанта из планшета **CLP** в планшет **LNP**. Во избежание перекрестной контаминации меняйте наконечники после каждого образца.



ПРИМЕЧАНИЕ:

Если какие-либо микрочастицы случайно перенеслись в наконечники, выпустите их обратно в планшет, оставьте планшет на магнитном штативе на 2 минуты до осветления супернатанта.

- 22 [Необязательно] Перенесите остальные 5 мкл супернатанта из планшета **CLP** в новый планшет и промаркируйте названием и датой прогона. Храните этот планшет при температуре от -25 °C до -15 °C до завершения прогона секвенирования и анализа данных. Эти очищенные продукты ПЦР можно использовать для поиска и устранения неисправностей в случае неудачного прогона образцов.
- 23 Запечатайте планшет **LNP** пленкой для планшетов и центрифугируйте при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы гарантировать, что весь супернатант находится на дне лунки.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

После очистки ПЦР продуктов планшет стабилен в течение 3 часов при температуре от 2 °C до 8 °C.

Нормализация библиотек

Этим способом нормализуют количество каждой библиотеки, чтобы обеспечить их равномерную представленность в объединенном образце библиотеки.

Расчетное время

Общая продолжительность: 1 час 20 минут

Ручные операции: 30 мин

Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)	1 пробирка	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1В
Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)	1 пробирка	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	3В
Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)	2 пробирки	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	3В
Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)	1 пробирка	15 °C – 30 °C	«Иллюмина»	5
0,1 N свежеприготовленный раствор NaOH	3 мл	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
96-луночный планшет для ПЦР с юбкой	1 планшет	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
коническая пробирка емкостью 15 мл	1 пробирка	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Пленка для запечатывания планшета	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может быть причинен в результате вдыхания, проглатывания, попадания на кожу и попадания в глаза. Во избежание риска воздействия используйте средства защиты, в том числе средства защиты глаз, перчатки и лабораторный халат. С использованными реагентами обращаются как с химическими отходами и утилизируют их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и нормативами. Дополнительные сведения о защите окружающей среды и безопасности см. паспорта безопасности на сайте support.illumina.com/sds.html.

Продолжение

- 1 Приготовьте свежий 0,1N раствор NaOH, добавляя 30 мкл 10 N NaOH к 2970 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз/ДНКаз.

- 2 Извлеките разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) из места хранения при температуре -25 °C до -15 °C и доведите до комнатной температуры. При необходимости используйте водяную баню на 20 °C—25 °C.



ПРИМЕЧАНИЕ

В разбавителе для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) могут образоваться видимые осадки или кристаллы. Перед использованием перемешайте его на вортексе, а затем осмотрите визуально пробирку, держа ее в вертикальном положении перед источником освещения, чтобы убедиться, что весь осадок полностью растворился.

- 3 Извлеките микрочастицы для библиотек (Library Beads) и раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash) из места хранения при температуре 2 °C до 8 °C и доведите до комнатной температуры. При необходимости используйте водяную баню на 20 °C—25 °C.

- 4 Тщательно перемешайте микрочастицы для библиотек (Library Beads) на вортексе в течение 1 минуты, периодически переворачивая пробирку, до тех пор, пока микрочастицы не ресуспендируются, а осадка на дне пробирки при ее переворачивании будет не видно.

- 1 Для 12 образцов/24 библиотек внесите 1575 мкл разбавителя для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) в новую коническую пробирку емкостью 15 мл.

- 2 Для гомогенизации микрочастиц используйте пипетку P1000, установленную на 1000 мкл, чтобы тщательно ресуспендировать микрочастицы для библиотек (Library Beads) перемешивайте их пипеткой (вверх и вниз 10 раз).



ПРИМЕЧАНИЕ

Крайне важно полностью ресуспендировать осадок микрочастиц для библиотек (Library Beads) на дне пробирки. Использование пипетки P1000 гарантирует однородное ресуспендирование. Это существенно для достижения единообразной плотности кластеров в проточной ячейке.

- 3 Для 12 образцов/24 библиотек перенесите пипеткой 300 мкл микрочастиц для библиотек (Library Beads) в пробирку, содержащую разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent). Хорошо перемешайте, переворачивая пробирку 15–20 раз.



ПРИМЕЧАНИЕ

Пипетка P1000, установленная на 1000 мкл, требуется для полного ресуспендирования микрочастиц на стадии 2. Смешивайте только указанные количества разбавителя для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) и микрочастиц для библиотек. Оставшийся разбавитель для разведения библиотек при нормализации и частицы для библиотек (Library Beads) необходимо хранить отдельно при соответствующей рекомендуемой температуре. Чтобы сохранить их стабильность, микрочастицы для библиотек (Library Beads) ни в коем случае не следует замораживать или смешивать с разбавителем для разведения библиотек при нормализации, (Library Normalization Diluent) если их не используют сразу.

- 4 С помощью многоканальной пипетки внесите 45 мкл объединенного рабочего

раствора разбавителя для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) и микрочастиц для библиотек (Library Beads) в каждую лунку планшета LNP, содержащего библиотеки. При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.

- 5 Запечатайте планшет LNP пленкой для планшетов.
- 6 Встряхивайте планшет LNP на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 30 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ

30-минутная инкубация принципиально важна для правильной нормализации библиотеки. Инкубация в течение большего или меньшего времени, может повлиять на представленность библиотеки и плотность кластеров.

- 7 Поместите планшет LNP на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
- 8 Пока планшет LNP находится на магнитном штативе, осторожно удалите супернатант в надлежащий контейнер для опасных отходов многоканальной пипеткой, установленной на 80 мкл.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если какие-либо микрочастицы случайно попали в наконечники, выпустите их обратно в планшет, оставьте планшет на магнитном штативе на 2 минуты или до осветления супернатанта.

- 9 Снимите планшет LNP с магнитного штатива и промойте микрочастицы раствором промывочным для нормализации библиотек (Library Normalization Wash), как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку с исследуемым образцом по 45 мкл раствора промывочного для нормализации библиотек (Library Normalization Wash).При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.
 - b Запечатайте планшет LNP пленкой для планшетов.
 - c Встряхивайте планшет LNP на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут.
 - d Поместите планшет LNP на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
 - e Осторожно удалите супернатант в надлежащий контейнер для опасных отходов.
- 10 Снимите планшет LNP с магнитного штатива и повторите промывку раствором промывочным для нормализации библиотек (Library Normalization Wash), как описано ниже:
 - a С помощью многоканальной пипетки внесите в каждую лунку по 45 мкл раствора промывочного для нормализации библиотек (Library Normalization Wash).При соблюдении осторожности во избежание перекрестной контаминации замена наконечников между колонками не требуется.
 - b Запечатайте планшет LNP пленкой для планшетов.
 - c Встряхивайте планшет LNP на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут.

- d Поместите планшет **LNP** на магнитный штатив минимум на 2 минуты.
- e Осторожно удалите супернатант в надлежащий контейнер для опасных отходов.
- f Запечатайте планшет **LNP** пленкой для планшетов.
- 11 Центрифугируйте планшет **LNP** при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 30 секунд, чтобы собрать оставшийся промывочный буфер.
- 12 Поместите планшет **LNP** на магнитный штатив.
- 13 Для удаления избытка раствора промывочного для нормализации библиотек (Library Normalization Wash) используйте многоканальную пипетку P20, установленную на 20 мкл.
- 14 Снимите планшет **LNP** с магнитного штатива и добавьте в каждую лунку по 30 мкл 0,1 N NaOH для элюирования образца.
- 15 Запечатайте планшет **LNP** пленкой для планшетов.
- 16 Встряхивайте планшет **LNP** на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут.
- 17 В течение 5-минутного встряхивания промаркируйте новый 96-луночный планшет для ПЦП **SGP_Plate_ID**.
- 18 Внесите в каждую лунку, которая будет использоваться в планшете **SGP**, по 30 мкл буфера для хранения библиотек (Library Storage Buffer).
- 19 После 5-минутного встряхивания убедитесь, что все образцы в планшете **LNP** ресуспендированы. Если образцы не ресуспендированы, осторожно перемешайте эти образцы пипеткой вверх и вниз или слегка постучите планшетом по столу, чтобы ресуспендировать микрочастицы, затем встряхивайте еще 5 минут.
- 20 [Необязательно] Центрифугируйте планшет **LNP** при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 30 секунд, чтобы собрать образцы на дне лунки.
- 21 Поместите планшет **LNP** на магнитный штатив минимум на 2 минуты.
- 22 С помощью многоканальной пипетки, установленной на 30 мкл, перенесите супернатант из планшета **LNP** в планшет **SGP**. Осторожно перемешайте пипеткой (вверх и вниз 5 раз).
-  **ПРИМЕЧАНИЕ**
Если какие-либо микрочастицы случайно попали в наконечники, выпустите микрочастицы обратно в планшет, оставьте планшет на магнитном штативе на 2 минуты или до осветления супернатанта.
- 23 Запечатайте планшет **SGP** пленкой для планшетов, а затем центрифугируйте при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 1 минуты. Сразу переходите к объединению библиотеки.

Описание библиотек

Перед секвенированием на генетическом секвенаторе MiSeqDx в процессе подготовки к этапу генерации кластеров и секвенированию объединяют равные объемы нормализованной библиотеки, разведенной в буфере для гибридизации (Hybridization Buffer), и подвергают термической денатурации. В качестве внутреннего контроля для секвенирования используют PhiX.

Расчетное время

- ▢ Общая продолжительность: 10 минут
- ▢ Ручные операции: 10 мин

Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)	2 пробирки	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1В
Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)	2 мкл	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	1В
0,1 N свежеприготовленный раствор NaOH	2,5 мл	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
1X Буфер TE	8 мкл	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Центрифужные микропробирки	По мере необходимости	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Стрип на восемь пробирок для ПЦР	1	15 °C – 30 °C	Пользователь	—
Ведерко со льдом	1	15 °C – 30 °C	Пользователь	—

Процедура подготовки библиотек

- 1 Установите температуру термоблока, подходящего для центрифужных пробирок емкостью 1,5 мл, на 96 °C.
- 2 Приготовьте ледяную баню в ведерке со льдом. Охладите буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) на ледяной бане.
- 3 Начните размораживать картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3).

Процедура разморозки картриджа

Ниже приведены инструкции, описывающие, как разморозить картридж с реагентами с помощью водяной бани комнатной температуры. Эта методика занимает приблизительно один час.

- 1 Извлеките картридж из места хранения при температуре -25 °C до -15 °C.
- 2 Поместите картридж в водяную баню, содержащую достаточное количество деионизированной воды комнатной температуры, погрузите основание картриджа до отметки допустимого уровня воды. Не допускайте превышения максимального уровня воды.



3. Оставьте картридж для размораживания в водяной бане комнатной температуры приблизительно на 60-90 мин или до полного размораживания.
 4. Извлеките картридж из водяной бани и осторожно постучите им по столу, чтобы удалить воду из основания картриджа. Высушите основание картриджа. Убедитесь, что вода не попала на картридж с реагентами сверху.
1. Приготовьте 0,1 N NaOH путем объединения следующих объемов в конической пробирке:
- + Вода, свободная от ДНКаз и РНКаз (2475 мкл)
 - + Исходный 10 N раствор NaOH (25 мкл)
2. Переверните пробирку несколько раз, чтобы перемешать содержимое.
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**
Использование свежеприготовленного раствора NaOH важно для денатурации PhiX для образования кластеров.
3. Для получения разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) объедините следующие объемы:
- + Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) (2 мкл)
 - + 1X Буфер TE (8 мкл)
4. Для получения денатурированного разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) объедините следующие объемы разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) и 0,1 N NaOH в центрифужной микропробирке:
- + Разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) (10 мкл)
 - + 0,1 N раствор NaOH (10 мкл)
5. Кратковременно перемешайте денатурированный разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) на вортексе.
6. Кратковременно центрифугируйте денатурированный разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control), чтобы собрать содержимое со стенок пробирки.
7. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре для денатурации контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) .
8. Для получения раствора контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) в буфере для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) объедините следующие объемы буфера для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) и денатурированного разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control).
- + Денатурированной разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) (20 мкл)
 - + Предварительно охлажденный буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)

(980 мкл)



ПРИМЕЧАНИЕ

Раствор контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control). /буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) можно хранить до 3-х недель при температуре от -25 °C до -15 °C в виде алиquot для однократного использования. После 3 недель количество кластеров начинает уменьшаться.

1. Переверните картридж десять раз, чтобы перемешать оттаявшие реагенты, а затем проверьте, чтобы все положения оттаяли.



ПРИМЕЧАНИЕ

Для эффективного секвенирования принципиально важно, чтобы реагенты в картридже полностью оттаяли и перемешались.

2. Проведите визуальный осмотр реагентов в положениях 1, 2 и 4, чтобы убедиться, что они полностью перемешались и не содержат осадков.

3. Осторожно постучите картриджем по столу, чтобы устранить пузырьки воздуха в реагентах.



ПРИМЕЧАНИЕ

Трубки системы подачи образцов генетического секвенатора MiSeqDx доходят до дна каждого резервуара реагентов, поэтому важно, чтобы в резервуарах не было пузырьков воздуха.

4. До готовности к началу прогона поместите картридж на лед или отставьте при температуре от 2 °C до 8 °C (до 6 часов). Для получения лучших результатов переходите непосредственно к загрузке образца и запуску прогона.

1. Доведите буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) до комнатной температуры. Перемешайте буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) на вортексе и убедитесь, что все осадки полностью растворились.

2. Центрифугируйте планшет **SGP** при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы собрать конденсат.

3. Промаркируйте новую центрифужную микропробирку **PAL_Plate_ID** (объединенная библиотека ампликонов).

4. Определите образцы для объединения. На каждый прогон секвенирования можно объединить 12 образцов/24 библиотеки.

5. Перенесите по 10 мкл каждой библиотеки для секвенирования из планшета **SGP**, колонку за колонкой, в стрип для ПЦР на восемь пробирок. Запечатайте планшет **SGP** клеящейся пленкой для планшетов и отставьте в сторону.

6. Объедините и перенесите содержимое стрипа для ПЦР на восемь пробирок в пробирку **PAL**. Тщательно перемешайте пробирку **PAL**.

7. Промаркируйте 3–6 новых центрифужных микропробирок **DAL_Plate_ID** (разведенная библиотека ампликонов).



ПРИМЕЧАНИЕ

Компания «Иллюмина» рекомендует приготовить 3 пробирки **DAL** для **PAL** для

будущего разведения.

- 8 Внесите в каждую пробирку **DAL** 784 мкл буфера для разведения библиотек (Library Dilution Buffer).
- 9 Внесите в каждую пробирку **DAL** 8 мкл раствора контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) в буфере для разведения библиотек (Library Dilution Buffer). Используя один и тот же наконечник, перемешайте пипеткой 3–5 раз вверх и вниз, чтобы промыть наконечник и гарантировать полный перенос.
- 10 Перенесите в каждую пробирку **DAL**, содержащую буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer), по 8 мкл из пробирки **PAL**. Используя один и тот же наконечник, перемешайте пипеткой (3–5 раз вверх и вниз), чтобы промыть наконечник и гарантировать полный перенос.
- 11 Перемешайте пробирки **DAL** на вортексе при максимальной скорости.
 **ПРИМЕЧАНИЕ**
Разведенную библиотеку **DAL** можно хранить при температуре от -25 °C до -15 °C в течение 30 суток.
- 12 Центрифугируйте одну пробирку **DAL** при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы собрать содержимое со стенок.
- 13 Инкубируйте пробирку **DAL** в термоблоке при 96 °C в течение 2 минут.
 **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**
Соблюдайте осторожность при извлечении пробирки. Пробирка и термоблок могут быть горячими.
- 14 После инкубации переверните пробирку **DAL** 1–2 раза, чтобы перемешать содержимое, затем сразу перенесите на ледяную баню.
- 15 Выдержите пробирку **DAL** на ледяной бане в течение 5 минут.
 **ПРИМЕЧАНИЕ**
Чтобы гарантировать эффективную загрузку образца в ячейку проточную MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell) на генетическом секвенаторе MiSeqDx, стадию термической денатурации необходимо выполнять непосредственно перед загрузкой содержимого **DAL** в картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3). Пробирки **DAL** необходимо подвергать термической денатурации непосредственно перед загрузкой в генетический секвенатор MiSeqDx.

Секвенирование библиотеки

Ячейку проточную промывают, высушивают и загружают в прибор генетический секвенатор MiSeqDx, образцы загружают в картридж, картридж загружают в генетический секвенатор MiSeqDx и начинают прогон секвенирования. Генетический секвенатор MiSeqDx выполняет стадии образования кластеров, секвенирования путем синтеза и анализ данных.

Расчетное время

Общая продолжительность секвенирования: ~28 часов

Ручные операции: ~5 мин

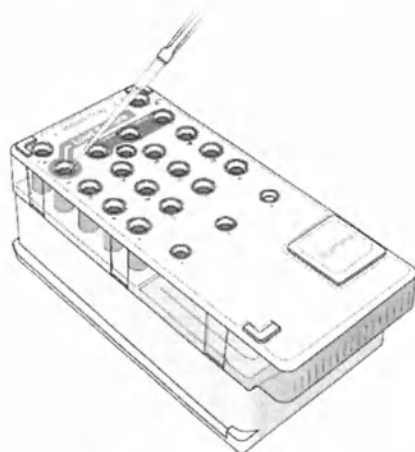
Расходные материалы

Позиция	Количество	Хранение	Поставщик	Коробка в наборе
Картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3)	1 предварительно наполненный картридж	-25 °C – -15 °C	«Иллюмина»	2
Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))	1 флакон	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	4
Ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell)	1 проточная ячейка	2 °C – 8 °C	«Иллюмина»	3B

Подробное описание перечисленных выше стадий см. в документе Справочное руководство к прибору генетический секвенатор MiSeqDx (документ №1000000021961).

- 1 Чтобы проколоть уплотнитель с мембраной из алюминиевой фольги над резервуаром на картридже MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3), маркированный **Загрузка образцов (Load Samples)**, используйте отдельный чистый пустой наконечник для пипетки на 1 мл.
- 2 Перенесите пипеткой 600 мкл библиотеки образцов DAL в резервуар **Загрузка образцов**. Старайтесь избегать касания уплотнителя с мембраной из алюминиевой фольги при перенесении образцов.
- 3 Проверьте наличие пузырьков воздуха в резервуаре после загрузки образца. При наличии пузырьков воздуха осторожно постучите картриджем по столу, чтобы выпустить пузырьки.

Загрузка библиотек



- 4 Введите имя пользователя и пароль в операционное программное обеспечение MiSeq (MOS), используя программу Local Run Manager.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если в программу загружены данные предыдущего пользователя, перед загрузкой данных выберите команду «Log Off» (Выйти из системы). Подтвердите, что отображается правильное имя пользователя или регистрационные данные.

- 5 На главной странице выберите «Sequence» (Последовательность).
- 6 Выберите прогон из перечня.
- 7 Подтвердите установку параметров прогона.
- 8 Очистите ячейку проточную.
- 9 Загрузите ячейку проточную.
- 10 Опорожните флакон с отходами и загрузите флакон с буфером MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)).
- 11 Загрузите картридж.
- 12 Прогон запускается автоматически после прохождения предварительной проверки.
- 13 Выполните промывку после прогона.

[Эта страница специально оставлена пустой]

Для технического сопровождения обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина»

Вебсайт: www.illumina.com

Адрес электронной почты: techsupport@illumina.com

Номера телефонов клиентской службы компании «Иллюмина»

Регион	Бесплатный номер телефона	Региональный
Северная Америка	+1 8008094566	
Австралия	+1 800775688	
Австрия	+43 800006249	+43 19286540
Бельгия	+32 80077160	+32 34002973
Китай	400 635 9898	
Дания	+45 80820183	+45 89871156
Финляндия	+358 800918363	+358 974790110
Франция	+33 805102193	+33 170770446
Германия	+49 8001014940	+49 8938035677
Гонконг	800960230	
Ирландия	+353 1800936608	+353 016950506
Италия	+39 800985513	+39 236003759
Япония	0800 111 5011	
Нидерланды	+31 8000222493	+31 207132960
Новая Зеландия	0800 451 650	
Норвегия	+47800 16836	+47 21939693
Сингапур	+1 800 579 2745	
Испания	+34 911899417	+34 800300143
Испания	+46 850619671	+46 200883979
Швейцария	+41 565800000	+41 800200442
Тайвань	00806651752	
Великобритания	+44 8000126019	+44 2073057197
Другие страны	+44 1799 534000	

Паспорта безопасности (ПБ) — доступны на вебсайте компании «Иллюмина» по адресу support.illumina.com/sds.html.



Документ № 1000000037191 v00

[Эта страница специально оставлена пустой]



«Иллюмина» (Illumina)
5200 Illumina Way
г. Сан-Диего, штат Калифорния 92122 США
(San Diego, California 92122 USA)
+1 800 809 1LMN (4566)
+1 858 202 4566 (за пределами Северной Америки)
techsupport@illumina.com



Российская Федерация

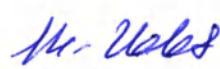
Город Москва.

Шестнадцатого июня две тысячи двадцатого года.

Я, Дейнеко Людмила Валериевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Прокошениковой Елены Евгеньевны, свидетельствую подлинность подписи переводчика Лебедева Андрея Николаевича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

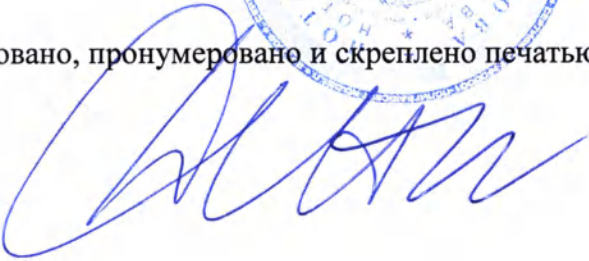
Зарегистрировано в реестре: № 21/86-н/77-2020- 

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 300 руб. 00 коп.

 Л.В. Дейнеко

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 16 лист(-а,-ов).

 Л.В. Дейнеко



Reagent kit Praxis™ Extended RAS Panel for qualitative determination of the status of specific mutations genes of RAS (KRAS (exons 2, 3, and 4) and NRAS (exons 2, 3, and 4) by sequencing a new generation in a human genomic DNA sample isolated from colorectal cancer tissue samples fixed in formalin and enclosed in paraffin blocks

Instruction for Use

Manufacturer:

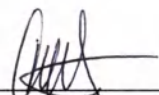
Illumina, Inc

Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA

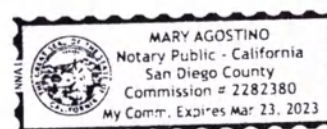
Approved

On behalf of Illumina, Inc.



Aurelia Brownridge
Sr. Regulatory Affairs Specialist
Illumina, Inc.

Date May 14, 2020



ACKNOWLEDGMENT

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California
County of San Diego)

On May 14 2020 before me, Mary Agostino, Notary Public
(insert name and title of the officer)

personally appeared Alexia Browne,
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are
subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in
his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the
person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing
paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Mary Agostino (Seal)



Praxis™ Extended RAS Panel

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE

Catalog # 20012431: 2 Runs, up to 10 samples plus 2 controls per run/20 samples per kit

Intended Use

The Praxis™ Extended RAS Panel is a qualitative *in vitro* diagnostic test using targeted high throughput parallel sequencing for the detection of 56 specific mutations in RAS genes [*KRAS* (exons 2, 3, and 4) and *NRAS* (exons 2, 3, and 4)] in DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) colorectal cancer (CRC) tissue samples. The test is intended to be used on the Illumina MiSeqDx® instrument.

Summary and Explanation of the Assay

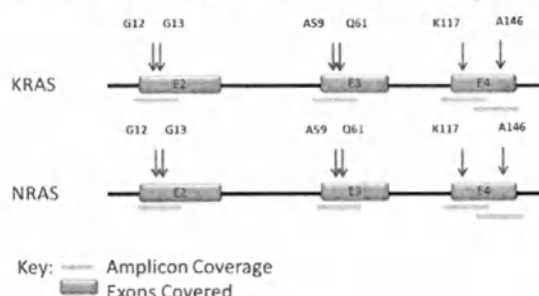
Clinical Description

Mutations in the RAS oncogenes are frequently found in human cancers. These mutations activate the mitogen-activated protein kinase pathway contributing to the malignant phenotype. Historically, *KRAS* exon 2 (codon 12 and 13) mutations were an established predictive biomarker of resistance to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy for metastatic colorectal cancer (mCRC). Multiple clinical trials have since established the value of extended RAS testing to include exon 2 (codons 12 and 13), exon 3 (codons 59 and 61), and exon 4 (codons 117 and 146) of either *KRAS*, or *NRAS*.¹ Overall, extended RAS mutations (*KRAS* exons 3, 4 and *NRAS* exons 2, 3, 4) account for 11% of patients with mCRC.¹ Taken together, mutations in *NRAS* and *KRAS* may affect up to approximately 53% of patients.^{1,2,3}

RAS Mutations in Panel

The Praxis Extended RAS Panel is an *in vitro* diagnostic test used in the detection of specific mutations in exons 2, 3, and 4 of *KRAS* and *NRAS*. Figure 1 depicts the general locations of the mutations within the exons of the genes. Codon changes with red arrows show location of mutations targeted in the assay.

Figure 1 RAS Genes (*KRAS* and *NRAS*) and Targeted Sequencing



The assay is designed specifically for the detection of the mutations from the *KRAS* and *NRAS* genes listed in Table 1. The assay simultaneously determines the presence or absence of each of the 56 mutations in every sequenced sample.

Praxis Extended RAS Panel

Praxis Extended RAS Panel Summary of Mutations*

Chromosome	Gene	Exon	Amino Acid	Wild Type > Mutation
chr12	KRAS	2	p.Gly13Val	c.38_39GC>TT
chr12	KRAS	2	p.Gly13Glu	c.38_39GC>AA
chr12	KRAS	2	p.Gly13Asp	c.38_39GC>AT
chr12	KRAS	2	p.Gly13Asp	c.38C>A
chr12	KRAS	2	p.Gly13Cys	c.37C>T
chr12	KRAS	2	p.Gly13Arg	c.37C>C
chr12	KRAS	2	p.Gly12Trp	c.34_36GGT>TGG
chr12	KRAS	2	p.Gly12Ala	c.35C>C
chr12	KRAS	2	p.Gly12Asp	c.35C>A
chr12	KRAS	2	p.Gly12Phe	c.34_35GG>TT
chr12	KRAS	2	p.Gly12Asn	c.34_35GG>AA
chr12	KRAS	2	p.Gly12Val	c.35C>T
chr12	KRAS	2	p.Gly12Ser	c.34C>A
chr12	KRAS	2	p.Gly12Cys	c.34C>T
chr12	KRAS	2	p.Gly12Arg	c.34C>C
chr12	KRAS	3	p.Gln61His	c.183A>C
chr12	KRAS	3	p.Gln61His	c.183A>T
chr12	KRAS	3	p.Gln61Leu	c.182A>T
chr12	KRAS	3	p.Gln61Arg	c.182A>G
chr12	KRAS	3	p.Gln61Lys	c.181C>A
chr12	KRAS	3	p.Gln61Glu	c.181C>G
chr12	KRAS	3	p.Ala59Gly	c.176C>G
chr12	KRAS	3	p.Ala59Thr	c.175G>A
chr12	KRAS	4	p.Ala146Val	c.437C>T
chr12	KRAS	4	p.Ala146Thr	c.436G>A
chr12	KRAS	4	p.Ala146Pro	c.436G>C
chr12	KRAS	4	p.Lys117Asn	c.351A>T
chr12	KRAS	4	p.Lys117Asn	c.351A>C
chr1	NRAS	2	p.Gly13Glu	c.38_39GT>AG
chr1	NRAS	2	p.Gly13Glu	c.38_39GT>AA
chr1	NRAS	2	p.Gly13Asp	c.38C>A
chr1	NRAS	2	p.Gly13Val	c.38C>T
chr1	NRAS	2	p.Gly13Cys	c.37C>T
chr1	NRAS	2	p.Gly13Arg	c.37C>C
chr1	NRAS	2	p.Gly12Trp	c.34_36GGT>TGG
chr1	NRAS	2	p.Gly12Ala	c.35C>C
chr1	NRAS	2	p.Gly12Val	c.35C>T
chr1	NRAS	2	p.Gly12Asp	c.35C>A
chr1	NRAS	2	p.Gly12Phe	c.34_35GG>TT

Chromosome	Gene	Exon	Amino Acid	Wild Type > Mutation
chr1	NRAS	2	p.Gly12Asn	c.34_35GG>AA
chr1	NRAS	2	p.Gly12Ser	c.34G>A
chr1	NRAS	2	p.Gly12Cys	c.34G>T
chr1	NRAS	2	p.Gly12Arg	c.34G>C
chr1	NRAS	3	p.Gln61His	c.183A>T
chr1	NRAS	3	p.Gln61His	c.183A>C
chr1	NRAS	3	p.Gln61Arg	c.182A>G
chr1	NRAS	3	p.Gln61Leu	c.182A>T
chr1	NRAS	3	p.Gln61Lys	c.181C>A
chr1	NRAS	3	p.Gln61Glu	c.181C>G
chr1	NRAS	3	p.Ala59Gly	c.176C>G
chr1	NRAS	3	p.Ala59Thr	c.175G>A
chr1	NRAS	4	p.Ala146Val	c.437C>T
chr1	NRAS	4	p.Ala146Thr	c.436G>A
chr1	NRAS	4	p.Ala146Pro	c.436G>C
chr1	NRAS	4	p.Lys117Asn	c.351G>C
chr1	NRAS	4	p.Lys117Asn	c.351G>T

* KRAS proto-oncogene, GTPase [Homo sapiens (human)] (Gene ID: 3845) - NM_004985.4, NP_004976.2.

* NRAS neuroblastoma RAS viral oncogene homolog [Homo sapiens (human)] (Gene ID: 4893) - NM_002524.4, NP_002515.1.

Testing for KRAS and NRAS mutations is recommended by the NCCN Guidelines® for all patients with mCRC. Only patients who have wild type RAS are eligible for anti-EGFR therapy⁴.

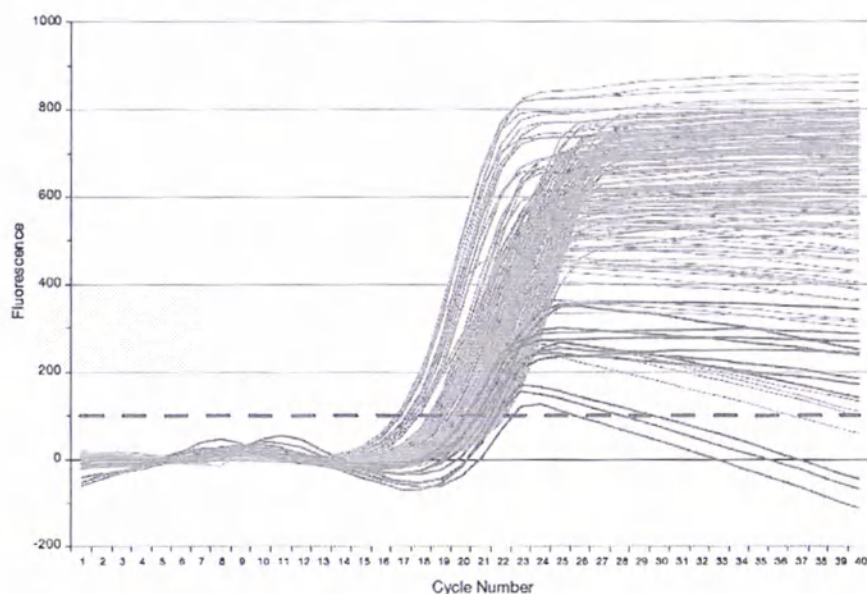
Principles of Procedure

The Illumina Praxis Extended RAS Panel involves three main procedures. The first is to qualify the DNA sample that can be used for the test (Figure 2). The second is to manually prepare the samples for sequencing, which is called library preparation. Library preparation consists of four key steps: Hybridization, Extension-Ligation, PCR Amplification, and Library Normalization (Figure 3). The third procedure is to sequence the prepared sample using SBS (sequencing by synthesis) chemistry on the MiSeqDx.

Qualification of FFPE Samples

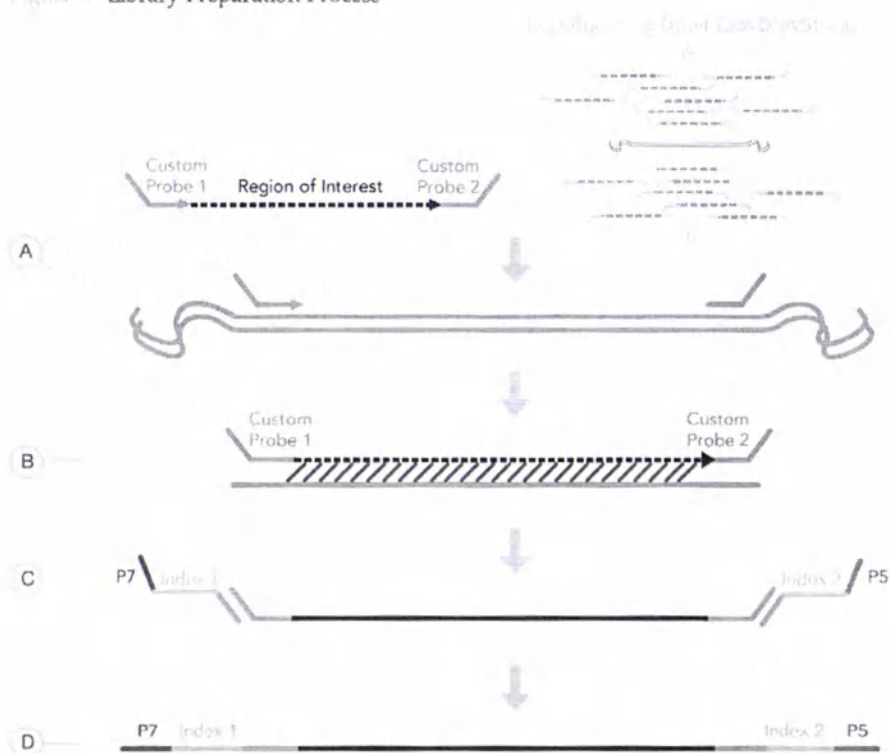
The Praxis Extended RAS Panel workflow starts with DNA qualification step which is performed to determine if the DNA is of sufficient quality for use with the Praxis Extended RAS Panel. Genomic DNA samples are qualified by measuring amplifiability relative to a control DNA template.

Figure 2 Amplification Graph



Library Preparation

Figure 3 Library Preparation Process



- A Hybridization**—A pool of upstream and downstream oligonucleotides specific to the targeted regions in the Praxis Extended RAS Panel is hybridized to the sample genomic DNA. Two oligonucleotide pools (A and B) independently test each strand of DNA. At the end of this process, a three-step wash procedure with a filter

capable of size selection removes unbound oligonucleotides from the genomic DNA.

- B **Extension-Ligation**—The second step, Extension-Ligation, connects the hybridized upstream and downstream oligonucleotides. A DNA polymerase extends from the upstream oligonucleotides through the targeted region, followed by ligation to the 5' end of the downstream oligonucleotide using a DNA ligase. The result is the formation of products that contain the RAS-specific oligonucleotides flanked by sequences required for amplification.
- C **PCR Amplification**—The third step, PCR Amplification, amplifies the extension-ligation products using primers that add index sequences for sample multiplexing, as well as common adapters required for cluster generation on the MiSeqDx. At the end of this process, a PCR clean-up procedure purifies the PCR products (referred to as a library).
- D **Library Normalization**—The final step, Library Normalization, normalizes the quantity of each library to ensure more equal library representation in the final pooled library. At the end of this process, the pooled library is loaded onto the MiSeqDx for sequencing using SBS chemistry.

Sequencing

SBS chemistry uses a reversible-terminator method to detect single nucleotide bases as they are incorporated into growing DNA strands. During each sequencing cycle, a single fluorescently-labeled deoxynucleotide triphosphate (dNTP) is added to the nucleic acid chain. The nucleotide label serves as a terminator for polymerization, so after each dNTP incorporation, the fluorescent dye is imaged to identify the base and then enzymatically cleaved to allow incorporation of the next nucleotide. Because all four- reversible terminator-bound dNTPs (A, G, T, C) are present as single, separate molecules, natural competition minimizes incorporation bias. Base calls are made directly from signal intensity measurements during each sequencing cycle. The result is base-by-base sequencing.

Data Analysis

The Praxis Extended RAS Panel module of the Local Run Manager software processes base calls generated during primary analysis and produces information about each sample, called secondary analysis. Secondary analysis includes demultiplexing, FASTQ file generation, alignment, variant calling, and report generation.

- ▶ **Demultiplexing**— This is the first step in secondary analysis. Demultiplexing separates data from pooled samples based on the unique sequence indexes that were added during the PCR amplification step.
- ▶ **FASTQ File Generation**—After demultiplexing, the Praxis Extended RAS Panel module generates intermediate files in the FASTQ format, which is a text format used to represent sequences. FASTQ files contain the reads for each sample and the quality scores, excluding reads from any clusters that did not pass filter.
- ▶ **Alignment**—Alignment compares sequences against the reference to identify a relationship between the sequences and assigns a score based on regions of similarity. Aligned reads are written to files in BAM format. Local Run Manager uses a banded Smith-Waterman algorithm that performs local sequence alignments to determine similar regions between two sequences.
- ▶ **Variant Calling**—Developed by Illumina, the somatic variant caller identifies mutations present at low frequency in the DNA sample. In order to minimize false positives due to FFPE artifacts, mutations are first called for each pool separately. Then, mutations from the two pools are compared and combined into a single output file. If found, only mutations listed in Table 1 are reported. For more information, see the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide (document # 1000000037191)*.
- ▶ **Report Generation**—Results are accessible through Local Run Manager in the Samples and Results tab for the run, and the following simple-text output file is generated:
 - ▶ **Extended RAS Panel Report**—Details whether each sample contains any of the mutations listed in the reference panel.

Limitations of the Procedure

- 1 For *in vitro* diagnostic use.
- 2 In this procedure, the **Extended RAS Panel Report** only determines the presence or absence of the NRAS and KRAS mutations listed in Table 1.

- 3 In a study assessing 685 banked specimens, 31% failed to meet the QC requirement of $dCq \leq 5.0$.
- 4 Neoplastic content is required to be $\geq 50\%$ in order for a FFPE tissue to be processed for sequencing.

Reagents

Reagents Provided

Illumina provides the following reagents for the Illumina Praxis Extended RAS Panel (Table 2–Table 10). Catalog # 20012431 has been configured for 2 runs with a maximum of 10 samples plus 2 controls per run.

Praxis Extended RAS Panel, Box 1

Table 2 Box 1A Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Hybridization Buffer	1 tube	4.32 ml	Buffered aqueous solution containing salts and formamide	-25°C to -15°C
Extension-Ligation Mix	1 tube	4.8 ml	Buffered aqueous solution containing proprietary blend of DNA polymerases, DNA ligase, and dNTPs	-25°C to -15°C
Index Primers A-H (A501-A508)	1 tube per primer	192 μ l	PCR primers with index sequences and sequencing adapters	-25°C to -15°C
Index Primers 1-12 (A701-A712)	1 tube per primer	128 μ l	PCR primers with index sequences and sequencing adapters	-25°C to -15°C
PCR Polymerase	1 tube	56 μ l	Proprietary DNA polymerase	-25°C to -15°C
PCR Master Mix	1 tube	2.8 ml	Buffered aqueous solution containing salts and dNTPs	-25°C to -15°C

Table 3 Box 1B Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Library Normalization Diluent	1 tube	4.6 ml	Buffered aqueous solution containing salts, 2-Mercaptoethanol, and formamide	-25°C to -15°C
Library Dilution Buffer	2 tubes	4.5 ml	Buffered aqueous solution	-25°C to -15°C
PhiX Internal Control	1 tube	10 μ l	Buffered aqueous solution containing PhiX genomic DNA	-25°C to -15°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 2

Table 4 Box 2 Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Contents	Storage
MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3	2 cartridges	Single-use cartridge that contains cluster generation and sequencing reagents for use with the MiSeqDx, including formamide, 2-Mercaptoethanol, and < 2% DMSO	-25°C to -15°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 3

Table 3 Box 3A Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Stringent Wash Buffer	1 bottle	24 ml	Buffered aqueous solution containing salts, 2-Mercaptoethanol and formamide	2°C to 8°C
Universal Wash Buffer	1 tube	4.8 ml	Buffered aqueous solution containing salts	2°C to 8°C

Table 4 Box 3B Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
PCR Clean-Up Beads	1 tube	5 ml	Buffered aqueous solution containing solid phase paramagnetic beads and polyethylene glycol	2°C to 8°C
Library Normalization Wash	2 tubes	4.8 ml	Buffered aqueous solution containing salts, 2-Mercaptoethanol and formamide	2°C to 8°C
Library Beads	1 tube	1.2 ml	Buffered aqueous solution containing solid phase paramagnetic beads	2°C to 8°C
MiSeq™ Dx Flow Cell	2 containers	1 flow cell	Glass substrate with covalently bound oligonucleotides	2°C to 8°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 4

Table 5 Box 4 Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)	2 bottles	500 ml	Buffered aqueous solution	2°C to 8°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 5

Table 6 Box 5 Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate	2 plates	N/A	Polypropylene microtiter plate with a modified polyethersulfone membrane	15°C to 30°C

Table 7 Box 5 Post-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Elution Buffer	1 tube	4.8 ml	Buffered aqueous solution	15°C to 30°C
Library Storage Buffer	1 tube	3.5 ml	Buffered aqueous solution	15°C to 30°C

Praxis Extended RAS Panel, Box 6

Table 1 Box 6 Pre-Amp Reagents

Component	Quantity	Fill Volume	Active Ingredients	Storage
Oligo Pool A—Extended RAS	1 tube	150 µl	Buffered aqueous solution containing oligonucleotides targeting the RAS genes	-25°C to -15°C
Oligo Pool B—Extended RAS	1 tube	150 µl	Buffered aqueous solution containing oligonucleotides targeting the RAS genes	-25°C to -15°C
Quality Control (QC) Primers	4 tubes	75 µl	Buffered aqueous solution containing oligonucleotides for DNA sample qualification	-25°C to -15°C
Quality Control (QC) Template	1 tube	220 µl	Buffered aqueous solution containing genomic DNA for sample qualification	-25°C to -15°C
qPCR Master Mix	2 tubes	1 ml	Buffered aqueous solution containing qPCR reaction components	-25°C to -15°C
Panel Control—Extended RAS	1 tube	8 µl	Buffered aqueous solution containing genomic DNA for assay positive control	-25°C to -15°C

Reagents Required, Not Provided

Pre-Amp Reagents

- ✦ 10 N NaOH (prepare from tablets or use a standard solution)
- ✦ TE Buffer
- ✦ RNase/DNase-free water

Post-Amp Reagents

- ✦ 10 N NaOH (prepare from tablets or use a standard solution)
- ✦ Ethanol, 200 proof for molecular biology
- ✦ TE Buffer
- ✦ RNase/DNase-free water

Storage and Handling

- 1 Room temperature is defined as 15°C to 30°C.
- 2 Reagents are provided in sufficient quantity for 2 separate uses of a maximum of 12 samples/24 libraries each, including controls. Between uses, reagents should be recapped and returned to their original storage temperatures, unless otherwise indicated as single use only.
- 3 The following reagents are shipped frozen and are stable when stored at -25°C to -15°C until the specified expiration date.
 - ✦ Oligo Pool A—Extended RAS
 - ✦ Oligo Pool B—Extended RAS
 - ✦ Hybridization Buffer
 - ✦ Extension-Ligation Mix
 - ✦ Index Primers A-H (A501-A508)
 - ✦ Index Primers 1-12 (A701-A712)
 - ✦ PCR Polymerase
 - ✦ PCR Master Mix
 - ✦ Library Normalization Diluent
 - ✦ Library Dilution Buffer
 - ✦ PhiX Internal Control
 - ✦ MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3
 - ✦ QC Primers
 - ✦ QC Template

- ▶ Panel Control—Extended RAS
- ▶ qPCR Master Mix

Except for the reagent cartridge, the reagents above are stable for a maximum of 5 freeze/thaw cycles that occur before the specified expiration date.

Index primers and the MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3 are single-use only.



CAUTION

Do not store reagents in a frost-free storage unit or store in door compartments.

Do not refreeze the reagent cartridge after it has been thawed. It can be stored up to 6 hours at 2°C to 8°C.

- 4 The following reagents are shipped refrigerated and are stable when stored at 2°C to 8°C until the specified expiration date.
 - ▶ Stringent Wash Buffer
 - ▶ Universal Wash Buffer
 - ▶ PCR Clean-Up Beads
 - ▶ Library Beads
 - ▶ Library Normalization Wash
 - ▶ MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)
 - ▶ MiSeq™ Dx Flow Cell

SBS Solution and Flow Cell are single-use only.
- 5 The following reagents are shipped ambient and are stable when stored at room temperature until the specified expiration date:
 - ▶ Elution Buffer
 - ▶ TruSeq™ Custom Amlicon Dx Filter Plate
 - ▶ Library Storage Buffer

Filter plate is single-use only.
- 6 Changes in the physical appearance of the reagents provided can indicate deterioration of the materials. If changes in the physical appearance occur (e.g., obvious changes in reagent color or cloudiness apparent with microbial contamination), do not use the reagents.
- 7 The Hybridization Buffer, Stringent Wash Buffer, and Library Normalization Diluent reagents might form visible precipitates or crystals. Before use, vortex vigorously, and then visually inspect to ensure that no precipitates are present.
- 8 Adhere to the following best practices when handling PCR Clean-Up Beads and Library Beads:
 - ▶ The beads should never be frozen.
 - ▶ Allow the beads to reach room temperature.
 - ▶ Immediately before use, vortex the beads until well-suspended and color appears homogeneous.
 - ▶ Thoroughly mix the sample after the beads are added by pipetting up and down 10 times. Alternatively, use a shaker to thoroughly mix samples.
 - ▶ Incubate the bead/sample mixture at room temperature for the entire duration indicated.
 - ▶ Follow instructions when using the magnetic stand. Wait for the solution to clear before aspirating. Keep the plate on the magnetic stand when slowly aspirating the supernatant, taking care not to disturb the separated beads.
- 9 The PCR amplification plate can remain on the thermal cycler overnight, or it can be stored at 2°C to 8°C for up to 2 days. Before storing the plate at 2°C to 8°C, seal the plate well.



CAUTION

Do not freeze the Library Beads or mix with the Library Normalization Diluent reagent if not used immediately.

- 10 The diluted amplicon library can be stored at -25°C to -15°C for up to 30 days.

Equipment and Materials

Equipment and Materials Required, Sold Separately

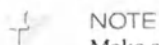
- 1 MiSeq Dx Instrument, Catalog # DX-410-1001

- 2 **TruSeq® Index Plate Fixture Kit**, Catalog # FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, Catalog # FC-130-1007

Equipment and Materials Required, Not Provided

Pre-Amp Equipment and Materials

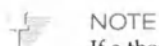
- 1 **DNA Extraction and Purification Reagents**—See *DNA Extraction* on page 12.
- 2 **Heat Block**—One heat block for a 96-well PCR plate is required. The heat block must meet the following performance specifications. Heat blocks with heated lids are required for use.
 - ▶ Temperature Range: Ambient +5°C to 99°C
 - ▶ Temperature Regulation: $\pm 0.1^\circ\text{C}$ at 37°C ; $\pm 0.4^\circ\text{C}$ at 60°C
- 3 **Sample Incubator**—One incubator (hybridization oven) is required. The incubator must meet the following performance specifications.
 - ▶ Temperature Range: 10°C to 100°C
 - ▶ Temperature Regulation: $\pm 0.2^\circ\text{C}$
- 4 **Tabletop Centrifuge**—One tabletop centrifuge is required. (A separate centrifuge is required in the post-amp area.) Any plate centrifuge that attains the designated speeds of the protocol (280 to $2400 \times g$) is acceptable.
- 5 **Microcentrifuge**—One microcentrifuge for microcentrifuge tubes.
- 6 **Precision Pipettes**—One set of precision pipettes is required. (A separate set is required in the post-amp area.) The use of precision pipettes is required to ensure accurate reagent and sample delivery. If they are calibrated regularly and are accurate within 5% of stated volume, single-channel or multi-channel pipettes can be used.
- 7 **Sealing Rollers or Sealing Wedge**—A sealing roller or sealing wedge are required for sealing microplates.
- 8 **Consumables**—The following consumables are required.
 - ▶ 96-well or 384-well optical PCR plates and seals
 - ▶ 96-well skirted PCR plates, 0.2 ml, polypropylene, or equivalent
 - ▶ 96-well storage plates, 0.8 ml (MIDI plates)



NOTE

Make sure that the 96-well plate is fit compatible with the magnetic stand.

- ▶ PCR eight-tube strips
- ▶ Solution basin, PVC, RNase/DNase-free (trough)
- ▶ Thermal microplate sealer



NOTE

If a thermal microplate sealer is not available, adhesive aluminum foil seal can be used.

- ▶ Adhesive aluminum foil seal
- ▶ Appropriate PCR plate seals
- ▶ Aerosol resistant pipette tips

Post-Amp Equipment and Materials

- 1 **96-Well or 384-Well Real-Time PCR Detection System**—One Real-Time PCR Detection system is required. The system must meet the following performance specifications. In addition, the system must have a heated lid and support a 96-well or 384-well format.
 - ▶ Minimum Temperature Range: 37°C to 95°C
 - ▶ Accuracy/Uniformity: $\pm 0.5^\circ\text{C}$
 - ▶ Dye: FAM
- 2 **Thermal Cycler**—One thermal cycler is required. The thermal cycler must have a heated lid and meet the following performance specifications:
 - ▶ Minimum Temperature Control Range: 4°C to 99°C
 - ▶ Control Accuracy: $\pm 0.3^\circ\text{C}$
- 3 **Optical Compression Pad**—An optical compression pad is recommended to provide a proper thermal seal between the PCR thermal cycler and reaction plates when using adhesive plate seals.

- 4 **Microplate Shaker**—One microplate shaker is required in the post-amp lab area. The plate shaker must meet the following performance specifications:
 - ▶ Maximum Mixing Speed: 3000 rpm
 - ▶ Mixing Speed Range: 200 to 3000 rpm
 - 5 **Tabletop Centrifuge**—One tabletop centrifuge is required. (A separate centrifuge is required in the pre-amp area.) Any plate centrifuge that attains the designated speeds of the protocol (280 to 2400 × g) is acceptable.
 - 6 **Heat Block**—One heat block for tubes is required. The heat block must meet the following performance specifications.
 - ▶ Temperature Range: Ambient +5°C to 99°C
 - ▶ Temperature Regulation: ±0.1°C at 37°C; ±0.4°C at 60°C
 - 7 **Magnetic Stand**—One magnetic stand for a 96-well plate is required. Better performance is seen when the magnets are on the side of the stand and not on the bottom.
 - 8 **Precision Pipettes**—One set of precision pipettes is required. (A separate set is required in the pre-amp area.) The use of precision pipettes is required to ensure accurate reagent and sample delivery. If they are calibrated regularly and are accurate within 5% of stated volume, single-channel or multi-channel pipettes can be used.
 - 9 **Gel Electrophoresis Supplies**—Gel electrophoresis supplies and apparatus are required along with an appropriate staining method to visualize PCR products in the gel.
 - 10 **Consumables**—The following consumables are required.
 - ▶ 96-well skirted PCR plates, 0.2 ml, polypropylene, or equivalent
 - ▶ 96-well storage plates, 0.8 ml (MIDI plates)
-  **NOTE**
Make sure that the 96-well plate is fit compatible with the magnetic stand.
- ▶ 2-4% TBE Agarose gel
 - ▶ 100 bp DNA molecular weight marker
 - ▶ DNA loading dye
 - ▶ Conical tubes, 15 ml
 - ▶ Microcentrifuge tubes
 - ▶ PCR eight-tube strips
 - ▶ Solution basins, PVC, RNase/DNase-free (trough)
 - ▶ Adhesive plate seals
 - ▶ Aerosol resistant pipette tips

Specimen Collection, Transport, and Storage

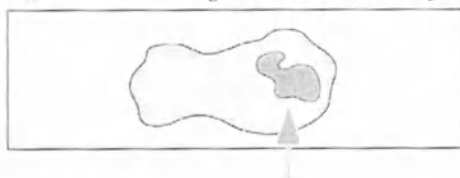
Tissue Assessment

The Praxis Extended RAS Panel utilizes DNA samples extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) colorectal cancer (CRC) tissue samples.

To prepare FFPE CRC tissue samples for DNA extraction:

- 1 Scrape excess paraffin away from the tissue using a fresh, sterile scalpel. Use serial sections for DNA extraction.
- 2 Use sections with ≥ 50% neoplastic content by area for processing without macrodissection.
- 3 For sections that are less than 50% neoplastic content by area, enrich neoplastic content by macrodissecting the sections to obtain ≥ 50% neoplastic content by area. In order to maximize total tissue area captured per slide, macrodissecting to obtain 50% neoplastic content by area is recommended.

Figure 4 Maximizing Total Tissue Area Captured per Slide During Macrodissection



20% neoplastic content by area.



Macrodissect to obtain $\geq 50\%$ neoplastic content by area, while maximizing total tissue area captured per slide.

- 4 Cumulative tissue area is the total tissue area per section times the total number of $5\ \mu\text{m}$ sections. For optimal results, recommended cumulative tissue area using $5\ \mu\text{m}$ sections is $240\ \text{mm}^2$ or greater with $\geq 50\%$ neoplastic content by area. For optimal yield of amplifiable DNA, use at least $8 \times 5\ \mu\text{m}$ sections or equivalent alternate thickness serial sections.

**NOTE**

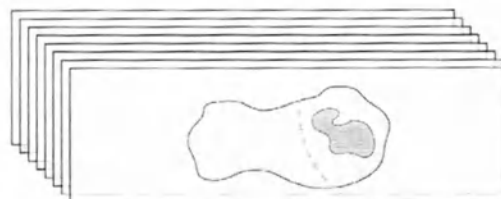
If macrodissection was performed, the macrodissected tissue area should be used in the determination of cumulative tissue area.



Recommended Cumulative Tissue Area is $\geq 240\ \text{mm}^2$

**Per Slide as Required:**

Macrodissect to obtain $\geq 50\%$ neoplastic content by area, while maximizing total tissue area captured per slide.

**Recommended Cumulative Tissue Area:**

For $5\ \mu\text{m}$ sections, $\geq 240\ \text{mm}^2$ cumulative tissue area with $\geq 50\%$ neoplastic content by area. For optimal DNA yield, use at least eight slides.

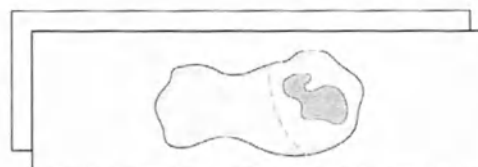
- 5 Minimum cumulative tissue area using $5\ \mu\text{m}$ sections is $80\ \text{mm}^2$ with $\geq 50\%$ neoplastic content by area. Equivalent cumulative tissue area for alternate thickness serial sections can also be used.



Minimum Cumulative Tissue Area is $80\ \text{mm}^2$

**Per Slide as Required:**

Macrodissect to obtain $\geq 50\%$ neoplastic content by area, while maximizing total tissue area captured per slide.

**Minimum Cumulative Tissue Area:**

For $5\ \mu\text{m}$ sections, $80\ \text{mm}^2$ cumulative tissue area with $\geq 50\%$ neoplastic content by area.

- 6 Extracted DNA samples giving a delta Cq value ≤ 5.00 can be used for the Praxis Extended RAS Panel.
7 [Optional] If extracted DNA samples do not meet the delta Cq threshold, additional sections can be used for extraction if available.

DNA Extraction

- ▶ Illumina recommends column-based DNA extraction kits, using double the amount of Proteinase K, overnight Proteinase K incubations with agitation, and final elutions in at least $30\ \mu\text{l}$ volume.
- ▶ Bead-based extraction methods and methods using only lysis of crude cell extracts are not recommended for use with this assay.

- ▶ Illumina recommends storing extracted genomic DNA between 2°C and 8°C for a maximum of 28 days or storing frozen between -15°C to -25°C for a maximum of 161 days. Genomic DNA stored frozen is stable for a maximum of 2 freeze/thaw cycles.

Warnings and Precautions



CAUTION

Federal law restricts this device to sale by or on the order of a physician or other practitioner licensed by the law of the State in which he/she practices, to use or order the use of the device.

- 1 Some components of this assay contain potentially hazardous chemicals. Personal injury can occur through inhalation, ingestion, skin contact, and eye contact. Wear protective equipment, including eye protection, gloves, and laboratory coat appropriate for risk of exposure. Handle used reagents as chemical waste and discard in accordance with applicable regional, national, and local laws and regulations. For additional environmental, health, and safety information, see the SDS at support.illumina.com/sds.html. (See *Reagents* on page 6 for more information.)
- 2 Handle all specimens as if they are potentially infectious agents.
- 3 Failure to follow the procedures as outlined may result in erroneous results or significant reduction in sample quality.
- 4 Use routine laboratory precautions. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, or smoke in designated work areas. Wear disposable gloves and laboratory coats when handling specimens and assay reagents. Wash hands thoroughly after handling specimens and assay reagents.
- 5 Do not use any assay components beyond their stated expiration date on the assay carton label. Do not interchange assay components from different assay lots. Assay lots are identified on the assay carton label.
- 6 Store the assay components at the specified temperature in designated pre-amplification and post-amplification areas.
- 7 Repeated freeze-thaw cycles (up to 5) of the Box 1 and Box 6 components will not compromise the integrity of the assay.
- 8 Index primers are single use only and should be discarded after use.
- 9 To prevent sample or reagent degradation, ensure that all sodium hypochlorite vapors have fully dissipated before starting the protocol.
- 10 Proper laboratory practices and good laboratory hygiene is required to prevent PCR products from contaminating reagents, instrumentation, and genomic DNA samples. PCR contamination may cause inaccurate and unreliable results.
- 11 To prevent contamination, ensure that pre-amplification and post-amplification areas have dedicated equipment (e.g., pipettes, pipette tips, vortexer, and centrifuge).
- 12 Avoid cross contamination. Use fresh pipette tips between samples and between dispensing reagents. Mix samples with a pipette and centrifuge the plate when indicated. Do not vortex the plates. Using aerosol-resistant tips reduces the risk of amplicon carry-over and sample-to-sample cross-contamination.
- 13 Index-sample pairing must match the printed plate layout exactly. Mismatches between the printed plate layout and the sample will result in loss of positive sample identification and incorrect result reporting.
- 14 Always prepare fresh 80% ethanol for wash steps. Ethanol can absorb water from the air, impacting results.
- 15 Ensure that all ethanol is removed from the bottom of the wells during wash steps. Residual ethanol may impact results.
- 16 Adhere to the specified drying time following the magnetic stand step to ensure complete evaporation. Residual ethanol can impact the performance of subsequent reactions.
- 17 Do not mix the Oligo Pool A and Oligo Pool B and Hybridization Buffer for storage. When combined, the Oligo Pools become unstable, even when stored frozen.
- 18 The use of thermal cyclers with active cooling (e.g., Peltier, thermoelectric cooled) is not recommended for the hybridization step. The passive cooling step is critical for proper hybridization.
- 19 Always add PCR Polymerase to the PCR Master Mix immediately before use. Never store the combined working solution.
- 20 During the library normalization step, it is critical to resuspend the library bead pellet. This is essential for achieving consistent cluster density on the MiSeq™ Dx flow cell.

- 21 Adhere to the specified incubation times in the library normalization step. Improper incubation can affect library representation and cluster density.
- 22 Due to the number of plate transfers and subsequent potential for contamination, extreme care should be taken to ensure that well contents remain fully in the well. Do not splash contents.
- 23 DNA samples giving a delta C_q value less than or equal to 5.00 can be used for the Praxis Extended RAS Panel. Illumina does not support the use of gDNA samples giving a delta C_q value of greater than 5.00 with the Praxis Extended RAS Panel.

Index Primer Sequences

Sequences for Index Primers A-H (A501-A508)

Index Primer	Sequence
Index Primer A (A501)	TGAACCTT
Index Primer B (A502)	TGCTAAGT
Index Primer C (A503)	TGTTCTCT
Index Primer D (A504)	TAAGACAC
Index Primer E (A505)	CTAATCGA
Index Primer F (A506)	CTAGAACA
Index Primer G (A507)	TAAGTTCC
Index Primer H (A508)	TAGACCTA

Sequences for Index Primers 1-12 (A701-A712)

Index Primer	Sequence
Index Primer 1 (A701)	ATCACGAC
Index Primer 2 (A702)	ACAGTGGT
Index Primer 3 (A703)	CAGATCCA
Index Primer 4 (A704)	ACAAACGG
Index Primer 5 (A705)	ACCCAGCA
Index Primer 6 (A706)	AACCCCTC
Index Primer 7 (A707)	CCCAACCT
Index Primer 8 (A708)	CACCACAC
Index Primer 9 (A709)	GAAACCCA
Index Primer 10 (A710)	TGTGACCA
Index Primer 11 (A711)	AGGGTCAA
Index Primer 12 (A712)	AGGAGTGG

Instructions for Use

Qualification of DNA Extracted from FFPE Samples

Preparation

- 1 Bring the QC Template, QC Primers, qPCR Master Mix, and genomic DNA to room temperature.
- 2 Place thawed tubes on ice.



NOTE

If using QC Template for the first time, aliquot 7 µl of QC Template into different PCR strip tubes for long-term storage to avoid freeze-thawing.

Procedure

- 1 Determine the plate layout of the qPCR reaction.

**NOTE**

Samples, QC Template, and No Template Control (NTC) all must be tested in triplicate. See the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191) for more information on plate layouts.

- 2 Add 5 µl of QC Template to 495 µl of RNase/DNase-free water in a microcentrifuge tube.
- 3 Vortex the dilution to mix the sample.
- 4 Add 1.5 µl of extracted genomic DNA to 148.5 µl of RNase/DNase-free water in a PCR eight-tube strip to make a 100-fold dilution.
- 5 Using a P200, pipette up and down 10 times to mix the dilutions.
- 6 Add 150 µl of the diluted QC Template to an unused well in the PCR eight-tube strip consistent with the plate layout.
- 7 To another unused well, add 150 µl of nuclease-free water for use as NTC sample.
- 8 Prepare the qPCR Master Mix reaction as follows for a 384-well or 96-well format. The master mix contains extra volume.
 - ▶ 384-Well Format
 - ▶ qPCR Master Mix: 5.0 µl/well (205 µl for 36 reactions)
 - ▶ QC Primers: 0.8 µl/well (33 µl for 36 reactions)
 - ▶ RNase/DNase-free Water: 2.2 µl/well (90 µl for 36 reactions)
 - ▶ 96-Well Format
 - ▶ qPCR Master Mix: 10.0 µl/well (410 µl for 36 reactions)
 - ▶ QC Primers: 1.6 µl/well (66 µl for 36 reactions)
 - ▶ RNase/DNase-free Water: 4.4 µl/well (180 µl for 36 reactions)

**NOTE**

See the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191) for more information on preparing the qPCR Master Mix reaction.

- 9 Mix reaction mix gently but thoroughly.
- 10 Place the reaction mix on ice and protect it from light until use.
- 11 Aliquot master mix into a trough or eight-tube strip to aid in dispensing with multi-channel pipettor.
- 12 Add 8 µl (384-well format) or 16 µl (96-well format) of the master mix to each well of the qPCR plate. Take care to pipette accurately into the wells as small variations will affect the assay.
- 13 Add 2 µl (384-well format) or 4 µl (96-well format) of the QC Template dilution, the sample dilutions, or nuclease-free water to each well of the plate. Take care to pipette accurately into the wells as small variations will affect the assay.
- 14 Seal the plate with the appropriate seal for your instrument, taking care to avoid cross-contamination and to avoid smudging the surface of the lids. Verify that the seal is oriented correctly and uniformly sealed.
- 15 Place the plate on an adapter (if needed) and centrifuge the plate to 1000 × g for 1 minute.
- 16 Ensure that the seal is free of any liquid or dust, place the plate on the qPCR machine in the correct orientation, then close the lid and run the following qPCR thermal profile:
 - ▶ Hot Start
 - ▶ 50°C for 2 minutes
 - ▶ 95°C for 10 minutes
 - ▶ x40
 - ▶ 95°C for 30 seconds
 - ▶ 57°C for 30 seconds
 - ▶ 72°C for 30 seconds
 - ▶ Confirm that the instrument captures images after the 72°C step.

**NOTE**

The C_q threshold should be set to a value appropriate for your instrument that avoids inaccurate measurements due to background.

- 17 After the final step, the thermal cycler analyzes the samples. Ensure that the QC Template produces expected amplification curves. On most systems, the QC Template should amplify at a C_q of approximately 15–22 cycles. Exclude replicates from a triplicate group that are > 0.5 C_q different from the rest of the group. At least two of the three replicates less than or equal to 0.5 C_q apart must be included

in the final calculation. If these criteria are not met, the qualification process should be repeated for those samples.

**NOTE**

Four or more samples per 10-sample run having replicates removed indicate technical errors and the qualification process for all samples should be repeated.

**NOTE**

If little to no measurable amplification occurs for two or more replicates, the qualification process should be repeated for those samples.

- 18 Replicates exhibiting abnormal amplification curves should be excluded.

**NOTE**

See the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191) for more information on appropriate amplification curves.

- 19 Subtract the average Cq for the QC Template from the average Cq for each sample (Sample Average Cq – QC Template Average Cq) to yield the delta Cq values for each sample. Record the delta Cq values and the sample dilution factors. The sample dilution factors are based on the recommendations in the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191).
- 20 Make sure that amplification of the NTC occurs at least 10 cycles after QC Template amplification.

**NOTE**

Repeat entire qualification process for all samples if NTC fails.

SAFE STOPPING POINT

Illumina recommends storing extracted genomic DNA between 2°C to 8°C for a maximum of 28 days or storing frozen between –15°C to –25°C for a maximum of 161 days. Genomic DNA stored frozen is stable for a maximum of 2 freeze/thaw cycles.

Set Parameters

For more information on the Local Run Manager software, see the *Local Run Manager Software Reference Guide for MiSeqDx* (document # 1000000011880) and the *Local Run Manager Praxis Extended RAS Panel Analysis Module Workflow Guide* (document # 1000000011875).

- 1 Log in to Local Run Manager.
- 2 Click **Create Run**, and select **Extended RAS**.
- 3 Make sure that "Create Run Praxis Extended RAS" is visible in the top left corner of the screen.
- 4 Enter a run name that identifies the run from sequencing through analysis.
Use alphanumeric characters, spaces, underscores, or dashes.
- 5 [Optional] Enter a run description to help identify the run.
Use alphanumeric characters.

Specify Samples for the Run

Specify samples for the run using the following options:

- ▶ **Enter samples manually**—Use the table on the Create Run screen.
- ▶ **Import samples**—Navigate to an external file in a comma-separated values (*.csv) format.

Enter Samples Manually

- 1 Click the plate region A1 or E7 to enter sample information in the samples table.
Region A1 is equivalent to the upper left quadrant of wells in the Hyb plate layout, and includes samples for Oligo Pools A and B.
Region E7 is equivalent to the lower right quadrant of wells in the Hyb plate layout, and includes samples for Oligo Pools A and B.
- 2 In the Pool A table, enter a unique sample name in the Sample Name field for each well you use.
Use alphanumeric characters, dashes, or underscores.
The sample name automatically populates the corresponding well in the Pool B table.
Dual index adapters for each Index Read, specific to the well, display as you enter a sample name.

- 3 [Optional] Although the default layout is recommended, to change the position of control samples, use the Positive Control or Negative Control drop down menu.
- 4 Click the print  icon to display the plate layout.
- 5 Select **Print** to print the plate layout as a reference for preparing libraries.
- 6 Click **Close**.
- 7 Click **Save Run**.

Import Samples

- 1 Click the plate region A1 or E7.
- 2 Click the **Export**  icon for an example template.
- 3 Enter a unique sample name in the template for up to 10 samples and save the file.
Use alphanumeric characters, dashes, or underscores.

[Data]	Sample Names as a 4 * 3 matrix	
Sample1	Sample5	Sample9
Sample2	Sample6	Sample10
Sample3	Sample7	Positive_Control
Sample4	Sample8	Negative_Control

- 4 Click **Import Samples**.
- 5 Browse to the location of the sample information file in *.csv file format.
- 6 When finished, click the print  icon to display the plate layout.
- 7 Select **Print** to print the plate layout as a reference for preparing libraries.
- 8 Click **Close**.
- 9 Click **Save Run**.

Hybridization of Oligonucleotide Pool

Preparation

- 1 Determine genomic DNA samples to be used in the assay. Samples giving a delta Cq value less than or equal to 5.00 can be used for the Praxis Extended RAS Panel.
- 2 [Optional] If extracted DNA samples do not meet the delta Cq threshold, additional tissue sections can be used for DNA extraction if available.
- 3 Bring the Oligo Pool A, Oligo Pool B, Hybridization Buffer, genomic DNA samples, and Panel Control sample to room temperature.
- 4 Vortex the Oligo Pool A, Oligo Pool B, and Hybridization Buffer vigorously to make sure that all precipitates have dissolved, then briefly centrifuge the tubes to collect liquid.
- 5 Set a 96-well heat block to 95°C.
- 6 Pre-heat an incubator to 37°C.
- 7 Create the run and enter sample plate information in the Praxis Extended RAS Panel analysis module. Verify the location of positive and negative controls and then print sample plate layout.

Procedure

- 1 Set out a new 96-well PCR plate (hereafter referred to as **HYB** plate).



NOTE

See the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191) for more information on suggested **HYB** plate layout.

- 2 Add 10 µl of TE Buffer to each of the Negative Control (No Template Control) wells for Oligo Pool A and Oligo Pool B.
- 3 For each 12 sample/ 24 library preparation, add 2.5 µl of Panel Control to 22.5 µl of TE Buffer in a microcentrifuge tube. Mix the diluted Panel Control thoroughly.
- 4 Add 10 µl of diluted Panel Control prepared in the previous step to each of the two Positive Control wells for Oligo Pool A and Oligo Pool B.
- 5 Dilute genomic DNA samples (if necessary) according to the recommendations in Table 13.

Table 13 Delta C_q Dilution Table

Delta C _q	< -1.51	-1.50 to -0.51	-0.50 to 0.50	0.51 to 1.50	1.51 to 5.00	> 5.00
Dilution	4x	2x	No dilution	No dilution	No dilution	Not supported

- 6 Add 10 µl of each genomic DNA sample (diluted as necessary) to the appropriate wells for Oligo Pool A and Oligo Pool B.

**NOTE**

For information on diluting your samples and the suggested plate layout for correct Oligo Pool A and Oligo Pool B well selection, see the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191).

- 7 Add 5 µl of the Oligo Pool A to all Oligo Pool A wells containing genomic DNA, Panel Control, and Negative Control. Then, add 5 µl of the Oligo Pool B to all Oligo Pool B wells containing genomic DNA, Panel Control, and Negative Control.
- 8 Add 40 µl of Hybridization Buffer to each sample in the **HYB** plate. Gently pipette up and down 3–5 times to mix.

**NOTE**

Ensure any crystals or precipitate in Hybridization Buffer have dissolved.

- 9 Seal the **HYB** plate and centrifuge 1000 × g at room temperature for 1 minute.
- 10 Place the **HYB** plate in the pre-heated block at 95°C and incubate for 1 minute.
- 11 Change the temperature of the same heat block to 40°C and incubate for 3–18 hours.

**NOTE**

Moving the plate from the 95°C heat block to another pre-heated block set to 40°C will adversely affect hybridization.

Removal of Unbound Oligonucleotides

Preparation

- Bring Extension-Ligation Mix, Stringent Wash Buffer, and Universal Wash Buffer to room temperature, and then vortex briefly.
- Assemble the filter plate assembly (hereafter referred to as the **FPU**) in order from bottom to top: MIDI plate, adapter collar, filter plate, and lid.
- Pre-wash the filter plate membrane as follows:
 - Add 50 µl of Stringent Wash Buffer to each well.
 - Cover the filter plate with the lid and centrifuge at 2400 × g at room temperature for 5 minutes.
 - If the wash buffer does not drain completely, centrifuge the filter plate again at 2400 × g at room temperature for 5 minutes.

Procedure

- Remove the **HYB** plate from the heat block and centrifuge at 1000 × g at room temperature for 1 minute.
- Transfer the entire volume (approximately 65 µl) of each sample to the corresponding wells of the filter plate.
- Cover the filter plate with the lid and centrifuge at 2400 × g at room temperature for 5 minutes.

**NOTE**

Make sure that liquid has drained after centrifugation. Repeat centrifugation if necessary.

- Wash the filter plate as follows:
 - Add 50 µl of Stringent Wash Buffer to each sample well.
 - Cover the filter plate with the lid and centrifuge at 2400 × g at room temperature for 5 minutes.
 - If the wash buffer does not drain completely, centrifuge the filter plate again at 2400 × g at room temperature for 5 minutes.

- 5 Repeat the wash as described in the previous step.

**NOTE**

If the wash buffer does not drain completely, centrifuge again at $2400 \times g$ at room temperature until all liquid has gone through (an additional 5–10 minutes).

- 6 Discard all the flow-through (containing formamide), then reassemble the **FPU**.
- 7 Add 45 μ l of Universal Wash Buffer to each sample well.
- 8 Cover the filter plate with the lid and centrifuge at $2400 \times g$ at room temperature for 5 minutes.

**NOTE**

Make sure that all liquid has drained after centrifugation. Repeat centrifugation if necessary.

Extension-Ligation of Bound Oligonucleotides

Procedure

- 1 Add 45 μ l of Extension-Ligation Mix to each sample well of the filter plate.
- 2 Seal the filter plate with adhesive aluminum foil, and then cover with the lid.
- 3 Incubate the **FPU** in the pre-heated 37°C incubator for 45 minutes.
- 4 While the **FPU** plate is incubating, prepare the AMP (Amplification Plate) as described in the following section.

PCR Amplification

Preparation

- 1 Prepare fresh 0.05 N NaOH by adding 25 μ l of 10 N NaOH to 4975 μ l of sterile water.
- 2 Determine the index primers to be used according to the plate graphic printout from Praxis Extended RAS Panel analysis module.
- 3 Bring PCR Master Mix and the appropriate index primers to room temperature. Vortex each thawed tube to mix, and then briefly centrifuge the tubes.
- 4 Arrange the primers in a rack using the following arrangements:
 - a Arrange Index Primers A-H (A501-A508) primer tubes (white caps, clear solution) vertically, aligned with rows A through H.
 - b Arrange Index Primers 1-12 (A701-A712) primer tubes (orange caps, yellow solution) horizontally, aligned with columns 1 through 12.
- 5 Set out a new 96-well PCR plate (hereafter referred to as the **AMP** plate).
- 6 Add index primers to the AMP plate as follows:
 - a Add 9 μ l of the selected index primers [A–H (A501–A508)] to the appropriate well in a column of the **AMP** plate.
 - b Add 9 μ l of the selected index primers [1–12 (A701–A712)] to the appropriate row of the **AMP** plate.
Tips must be changed after each row to avoid index cross-contamination.

**NOTE**

Index primers are single use only and should be discarded immediately after use.

- 7 Prepare the PCR Master Mix/PCR Polymerase PCR working solution as follows:
 - a For 12 samples/24 libraries, add 21 μ l of PCR Polymerase to 1050 μ l of PCR Master Mix.
 - b Invert the prepared PCR working solution 20 times to mix.

The PCR working solution is stable at room temperature for 10 minutes and can also be stored on ice if needed during preparation.

Procedure

- 1 Remove the **FPU** from the incubator, and then remove the aluminum foil seal.
- 2 Cover the filter plate with the lid and centrifuge at $2400 \times g$ at room temperature for 2 minutes.
- 3 Add 25 μ l of 0.05 N NaOH to each sample well on the filter plate. Pipette the NaOH up and down 5–6 times to make sure the NaOH contacts the filter.

- 4 Cover and incubate the filter plate at room temperature for 5 minutes.
 - 5 While the filter plate is incubating, transfer 22 µl of the PCR working solution to each well of the AMP plate containing index primers.
 - 6 Transfer samples eluted from the filter to the AMP plate as follows:
 - a Pipette the samples in the first column of the filter plate up and down 5–6 times.
-  **NOTE**
Slightly tilt the **FPU** plate to ensure complete aspiration and to avoid air bubbles.
- b Transfer 20 µl from the filter plate to the corresponding column of the **AMP** plate.
 - c Gently pipette up and down 5–6 times to thoroughly combine the DNA with the PCR working solution.
 - d Transfer the remaining columns from the filter plate to the AMP plate in a similar manner. *Tips must be changed after each column to avoid index and sample cross-contamination.*
- 7 Seal the **AMP** plate and secure with a rubber roller.
 - 8 Centrifuge at 1000 × g at room temperature for 1 minute.
 - 9 Transfer the AMP plate to the post-amplification area.
 - 10 Perform PCR using the following program on a thermal cycler:
 - ▶ 95°C for 3 minutes
 - ▶ 32 cycles of:
 - ▶ 95°C for 30 seconds
 - ▶ 66°C for 30 seconds
 - ▶ 72°C for 60 seconds
 - ▶ 72°C for 5 minutes
 - ▶ Hold at 10°C

SAFE STOPPING POINT

If not proceeding immediately to PCR Clean-Up, the **AMP** plate can remain on the thermal cycler overnight, or can be stored at 2°C to 8°C up to 48 hours.

Verify Library Preparation

- 1 Combine 5 µl of amplified product with 15 µl of RNase/DNase-free water and DNA loading dye if necessary.
- 2 Run on a 2-4% TBE agarose gel with 100 bp ladder to confirm the presence and brightness of the 250-280 bp library product.
 - ▶ Samples that show amplification in both Oligo Pool A and B are considered valid and can be processed through the remainder of the workflow.
 - ▶ Samples showing little to no amplification in one Oligo Pool or both Oligo Pools are considered invalid and should not be processed through the remainder of the workflow. If an invalid gel result is observed, library preparation for that sample or samples will need to be repeated.
 - ▶ The Negative Control sample should show an Invalid gel result. If the Negative Control sample shows amplification in both Oligo Pool A and B, this indicates potential processing errors, i.e. contamination, pipetting errors, or sample mix-ups. The operator should evaluate the root cause and repeat library preparation as appropriate. If contamination is suspected, library preparation for all samples should be repeated. If pipetting errors or mix-ups are suspected, repeat library preparation for the affected samples.



NOTE

For more information and examples of valid and invalid results, see the *Praxis Extended RAS Panel Reference Guide* (document # 1000000037191).

PCR Clean-Up

Preparation

- 1 Bring the PCR Clean-Up Beads to room temperature.

- 2 Prepare fresh 80% ethanol from absolute ethanol. For 12 samples/24 libraries, prepare 80% ethanol using 12 mL of absolute ethanol and 3 mL of DNase/RNase-free water. Mix thoroughly.

Procedure

- 1 Centrifuge the **AMP** plate at $1000 \times g$ at room temperature for 1 minute.
- 2 Set out a new MIDI plate (hereafter referred to as the **CLP** plate).
- 3 Invert PCR Clean-Up Beads 10 times. Vortex vigorously and then invert 10 more times. Visually inspect solution to ensure that beads are resuspended.
- 4 Add 55 μ l of PCR Clean-Up Beads to each well of the **CLP** plate.
- 5 Transfer the entire PCR product from the **AMP** plate to the **CLP** plate.
- 6 Seal the **CLP** plate and shake on a microplate shaker at 1800 rpm for 2 minutes.
- 7 Incubate at room temperature without shaking for 10 minutes.
- 8 Place the plate on a magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
- 9 With the **CLP** plate on the magnetic stand, carefully remove and discard the supernatant.
- 10 With the **CLP** plate on the magnetic stand, wash the beads as follows:
 - a Add 200 μ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for a minimum of 30 seconds or until the supernatant is clear.
 - c Carefully remove and discard the supernatant.
- 11 Repeat the wash as described in the previous step.
- 12 Use a P20 multi-channel pipette set to 20 μ l to remove excess ethanol. Do not disturb or touch the beads.
- 13 Remove the **CLP** plate from the magnetic stand and air-dry the beads for 5 minutes.
- 14 Add 25 μ l of Elution Buffer to each sample.
- 15 Seal the **CLP** plate and shake on a microplate shaker at 1800 rpm for 5 minutes. After shaking, verify if samples were resuspended. If not, repeat this step.
- 16 Place the **CLP** plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
- 17 Set out a new MIDI plate (hereafter referred to as the **LNP** plate).
- 18 Transfer 20 μ l of the supernatant from the **CLP** plate to the **LNP** plate.
- 19 [Optional] Transfer the remaining 5 μ l of supernatant from the **CLP** plate to a new plate and label the plate with a run name and date. Store this plate at -25°C to -15°C until completion of the sequencing run and data analysis. The cleaned up PCR products can be used for troubleshooting efforts in the event of sample failures.
- 20 Seal the **LNP** plate with an adhesive plate seal, and then centrifuge at $1000 \times g$ at room temperature for 1 minute to ensure all the supernatant is at the bottom of the well.

SAFE STOPPING POINT

After PCR Clean-Up, the plate is stable for up to 3 hours at 2°C to 8°C .

Library Normalization

Preparation

- 1 Prepare fresh 0.1 N NaOH by adding 30 μ l of 10 N NaOH to 2970 μ l of RNase/DNase-free water.
- 2 Bring Library Normalization Diluent, Library Beads, and Library Normalization Wash to room temperature.
- 3 Vortex Library Normalization Diluent vigorously and ensure that all precipitates have dissolved.
- 4 Vortex Library Beads vigorously for 1 minute with intermittent inversion until the beads are resuspended and no pellet is found at the bottom of the tube when the tube is inverted.

Procedure

- 1 Mix Library Normalization Diluent and Library Beads in a fresh 15 ml conical tube as follows:
 - a For 12 samples/24 libraries, add 1575 μ l of Library Normalization Diluent to a 15 ml conical tube.
 - b To homogenize beads, use a P1000 pipette set to 1000 μ l to resuspend Library Beads thoroughly by pipetting up and down 10 times.

**NOTE**

It is critical to completely resuspend the library bead pellet at the bottom of the tube. The use of a P1000 ensures that the beads are homogeneously resuspended and that there is no bead mass at the bottom of the tube. This is essential for achieving consistent cluster density on the flow cell.

- c For 12 samples/24 libraries, pipette 300 μ l of Library Beads to the tube containing Library Normalization Diluent.
 - d Mix by inverting the tube 15–20 times.
- 2 Add 45 μ l of the combined Library Normalization Diluent/Library Beads working solution to each well of the LNP plate containing libraries.
 - 3 Seal the LNP plate and shake on a microplate shaker at 1,800 rpm for 30 minutes.
 - 4 Place the LNP plate on a magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
 - 5 With the LNP plate on the magnetic stand, carefully remove and discard the supernatant.
 - 6 Remove the LNP plate from the magnetic stand and wash the beads with Library Normalization Wash as follows:
 - a Add 45 μ l of Library Normalization Wash to each sample well.
 - b Seal the LNP plate and shake on a microplate shaker at 1,800 rpm for 5 minutes.
 - c Place the LNP plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes or until the supernatant is clear.
 - d Carefully remove and discard the supernatant.
 - 7 Repeat the Library Normalization Wash procedure as described in the previous step.
 - 8 Seal the LNP plate with an adhesive plate seal.
 - 9 Centrifuge the LNP plate at $1000 \times g$ at room temperature for 30 seconds to collect residual wash buffer.
 - 10 Place the LNP plate on the magnetic stand.
 - 11 Use a P20 multi-channel pipette set to 20 μ l to remove excess Library Normalization Wash.
 - 12 Remove the LNP plate from the magnetic stand and add 30 μ l of 0.1 N NaOH to each well.
 - 13 Seal the LNP plate and shake on a microplate shaker at 1,800 rpm for 5 minutes.
 - 14 During the 5-minute shake, set out a new 96-well PCR plate (hereafter referred to as the SGP plate.)
 - 15 Add 30 μ l Library Storage Buffer to each well to be used in the SGP plate.
 - 16 After the 5-minute shake, ensure that all samples in the LNP plate are resuspended. If the samples are not resuspended, gently pipette those samples up and down or lightly tap the plate on the bench to resuspend the beads, then shake for another 5 minutes.
 - 17 [Optional] Centrifuge the LNP plate at $1000 \times g$ at room temperature for 30 seconds to collect contents to the bottom of the wells.
 - 18 Place the LNP plate on the magnetic stand for a minimum of 2 minutes.
 - 19 Transfer the supernatant from the LNP plate to the SGP plate. Gently pipette up and down 5 times to mix.
 - 20 Seal the SGP plate and then centrifuge at $1,000 \times g$ at room temperature for 1 minute. Proceed immediately to Library Pooling.

Library Pooling

Prepare for Library Pooling

- 1 Set a heat block suitable for 1.5 ml centrifuge tubes to 96°C.
- 2 In an ice bucket, prepare an ice-water bath. Chill the Library Dilution Buffer in the ice-water bath.
- 3 Begin thawing the MiSeq™ Dx SBS cartridge v3.

Prepare the Reagent Cartridge

- 1 Thaw the MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3 in a water bath containing enough room temperature deionized water to submerge the base of the reagent cartridge up to the water line printed on the reagent cartridge. Do not allow the water to exceed the maximum water line.
- 2 Allow the reagent cartridge to thaw in the room temperature water bath for approximately 1 hour or until thawed.

- 3 Remove the cartridge from the water bath and gently tap it on the bench to dislodge water from the base of the cartridge. Dry the base of the cartridge. Make sure that no water has splashed on the top of the reagent cartridge.

Denature and Dilute PhiX Internal Control

- 1 Prepare 0.1 N NaOH by combining the following volumes in a conical tube:

- ▶ DNase, RNase-free water (2475 µl)
- ▶ Stock 10 N NaOH (25 µl)

- 2 Invert the tube several times to mix.



CAUTION

Using freshly diluted NaOH is essential in order to denature PhiX for cluster generation on the MiSeqDx.

- 3 Combine the following volumes to make Diluted PhiX Internal Control:

- ▶ PhiX Internal Control (2 µl)
- ▶ 1X TE Buffer (8 µl)

- 4 Combine the following volumes to make Denatured Diluted PhiX Internal Control:

- ▶ Diluted PhiX Internal Control (10 µl)
- ▶ 0.1 N NaOH (10 µl)

- 5 Vortex briefly to mix the Denatured Diluted PhiX Internal Control.

- 6 Briefly centrifuge the Denatured Diluted PhiX Internal Control to collect contents.

- 7 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the PhiX Internal Control into single strands.

- 8 Combine the following volume of pre-chilled Library Dilution Buffer and Denatured Diluted PhiX Internal Control to make PhiX/Library Dilution Buffer solution.

- ▶ Denatured Diluted PhiX Internal Control (20 µl)
- ▶ Pre-chilled Library Dilution Buffer (980 µl)

Inspect the Reagent Cartridge

- 1 Invert the reagent cartridge ten times to mix the thawed reagents, and then inspect that all positions are thawed.



NOTE

It is critical that the reagents in the cartridge are thoroughly thawed and mixed to ensure proper sequencing.

- 2 Inspect reagents in positions 1, 2, and 4 to make sure that they are fully mixed and free of precipitates.

- 3 Gently tap the cartridge on the bench to reduce air bubbles in the reagents.



NOTE

The MiSeqDx sipper tubes go to the bottom of each reservoir to aspirate the reagents, so it is important that the reservoirs are free of air bubbles.

- 4 Place the reagent cartridge on ice or set aside at 2°C to 8°C (up to 6 hours) until ready to set up the run. For best results, proceed directly to loading the sample and setting up the run.

Prepare Samples for Sequencing

- 1 Bring Library Dilution Buffer to room temperature. Vortex Library Dilution Buffer and ensure that all precipitates have dissolved completely.

- 2 Centrifuge the SGP plate at 1000 × g at room temperature for 1 minute.

- 3 Set out a fresh microcentrifuge tube (hereafter referred to as the PAL tube.)

- 4 Determine the samples to be pooled for sequencing. A maximum of 12 samples/24 libraries can be pooled for each sequencing run.

- 5 Transfer 10 µl of each library to be sequenced from the SGP plate, column by column, to a PCR eight-tube strip. Seal SGP with an adhesive plate seal and set aside.

- 6 Combine and transfer the contents of the PCR eight-tube strip into the PAL tube. Mix the PAL tube thoroughly.

- 7 Set out 3–6 fresh microcentrifuge tubes (hereafter referred to as the DAL tube.)

- 8 Add 784 µl of Library Dilution Buffer to each DAL tube.

- 9 Add 8 µl of PhiX/Library Dilution Buffer solution to each **DAL** tube. Pipette up and down 3–5 times to rinse the tip and ensure complete transfer.
- 10 Transfer 8 µl of **PAL** to each **DAL** tube containing Library Dilution Buffer. Pipette up and down 3–5 times to rinse the tip and ensure complete transfer.
- 11 Mix the **DAL** tubes by vortexing the tube at top speed.

**NOTE**

The diluted library **DAL** can be stored at -25°C to -15°C for up to 30 days.

- 12 Centrifuge the one **DAL** tube at room temperature for 1 minute to collect contents.
- 13 Incubate the **DAL** tube on a heat block at 96°C for 2 minutes.

**WARNING**

Use caution when removing the tube. The tube and the heat block may be hot.

- 14 After the incubation, invert the **DAL** tube 1–2 times to mix, then immediately place in the ice-water bath.
- 15 Keep the **DAL** tube in the ice-water bath for 5 minutes.

**NOTE**

You must perform the heat denaturation step immediately before loading **DAL** into the MiSeq™ Dx SBS cartridge v3 ensure efficient template loading on the MiSeq™ Dx flow cell Replicate **DAL** tubes must be heat denatured immediately before MiSeqDx loading.

Library Sequencing

Procedure

For details on the steps outlined here, see the *MiSeqDx Instrument Reference Guide* (document # 1000000021961).

- 1 Use a separate, clean, and empty 1 ml pipette tip to pierce the foil seal over the reservoir on the MiSeqDx Cartridge labeled **Load Samples**.
- 2 Pipette 600 µl of the sample DAL libraries into the **Load Samples** reservoir. Take care to avoid touching the foil seal while dispensing the sample.
- 3 Check for air bubbles in the reservoir after loading sample. If air bubbles are present, gently tap the cartridge on the bench to release the bubbles.
- 4 Log in to the MiSeq Operating Software (MOS) using your Local Run Manager user name and password.

**NOTE**

If a previous user is logged in, select **Log Off** before logging in. Confirm that the proper username or login credentials are displayed.

- 5 From the Home screen, select **Sequence**.
- 6 Select a run from the list.
- 7 Confirm the run settings.
- 8 Clean the flow cell.
- 9 Load the flow cell.
- 10 Empty the waste bottle and load the MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2) bottle.
- 11 Load the reagent cartridge.
- 12 The run automatically starts after passing pre-run checks.
- 13 Perform a post-run wash.

View Analysis Results

- 1 From the Local Run Manager dashboard, click the run name.
- 2 Click the Samples and Results tab to view the analysis report.
 - If analysis was repeated, expand the Select Analysis drop-down list and select the appropriate analysis.
- 3 [Optional] Click the **Copy to Clipboard**  icon to copy the Analysis folder path.

Interpretation of Results

- 1 The Illumina Praxis Extended RAS Panel is designed to detect the *KRAS* and *NRAS* mutations listed in Table 1.
- 2 Analysis results are summarized on the Samples and Results tab. The report is also available for export.

Praxis Extended RAS Panel Report

The Praxis Extended RAS Panel Report details if a run passed or failed, and whether each sample contains any of the 56 Extended RAS Panel mutations.

The Run State on the Samples and Results tab shows if the sequencing run passed quality metrics. If the Run State is Fail, all samples are listed as invalid.

Sample Results

Table 14 Sample Results Table

Column Heading	Description
Sample Name	The sample name provided when the run was created.
Sample	Sample validity results. Valid — Presence or absence of panel mutations is reported. Invalid — Presence or absence of panel mutations cannot be determined. See <i>Sample Invalid</i> on page 25.
Result	Sample results for panel mutation detection. See <i>Panel Mutation Detected</i> on page 25 and <i>Panel Mutation Not Detected</i> on page 25.
Gene	The gene, <i>KRAS</i> or <i>NRAS</i> , where a mutation is detected, if applicable.
Exon	The exon number in which the mutation is present, if applicable.
Amino Acid	Human Genome Variation Society (HGVS) amino acid change notation.
Nucleotide	HGVS nucleotide change notation.

Sample Invalid

The sample result, Invalid, indicates that the presence or absence of a Praxis Extended RAS Panel mutation cannot be determined. Repeat library preparation, sequencing, and analysis for Invalid samples. If a sample fails 2 times, additional troubleshooting can be necessary. If all samples in a run are Invalid because of a Run State of Fail, contact Illumina Technical Support.

Panel Mutation Detected

The sample result, Panel Mutation Detected, indicates that a Praxis Extended RAS Panel mutation is detected. The report lists all detected mutations.

Panel Mutation Not Detected

The sample result, Panel Mutation Not Detected, indicates that no Praxis Extended RAS Panel mutations are detected.

Quality Control Procedures

Good laboratory practices dictate that control material should be evaluated to detect differences in processing and technical procedures in the user's laboratory that may produce significant variability in results.

- 1 **Positive Controls (Panel Control)**—The Panel Control is required on every run. The Panel Control has 2 mutations, *KRAS* Exon 2 p.Gly12Asp c.35G>A and *NRAS* Exon 3 p.Gln61Lys c.181C>A. The Panel Control must generate the expected genotype to be valid. If the control is invalid, processing errors may have occurred. The software will fail the entire sequencing run and all samples will appear as Invalid.

- 2 **Negative (No Template/No DNA) Control**— The use of a negative (no template/no DNA) control (Blank) is required on every run. For a valid run, the Blank sample should appear as Invalid. If an unexpected outcome occurs in the Blank sample, the software will fail the entire sequencing run and all samples will appear as Invalid.
- 3 Before using this assay in the laboratory, the performance of the assay should be verified by testing a number of positive and negative samples with known performance characteristics.
- 4 All quality control requirements should be performed in accordance with local, state, and/or federal regulations or accreditation requirements.
- 5 If a sequencing run has failed, contact Illumina Technical Support to troubleshoot your run.

Performance Characteristics

Definitions Of Calculations Used In Performance Characteristics

Sample Qualification (Sample QC) Pass Rate: The Sample QC pass rate is defined as the percent of specimens that meet the sample quality control specification ($dCq \leq 5$).

Sample First Pass Rate: Sample first pass rate is defined as the percent of specimens that give a valid result the first time they are processed.

Agreement Calculations: The Praxis Extended RAS Panel is designed to specifically detect 56 mutations in the KRAS and NRAS genes. The assay simultaneously determines the presence or absence of each of the 56 mutations in every sequenced sample. The reference for agreement calculations is bi-directional Sanger sequencing or a control condition where indicated.

- 1 Overall percent agreement (OPA) is calculated as the number of mutant and non-mutant positions that agree with the reference divided by the total number possible mutant and non-mutant positions for all valid replicates. OPA is calculated on a per mutation basis; there are 56 mutations per sample. Overall percent agreement was calculated as follows:

$$(\# \text{ specimens} \times 56 \text{ mutant and non-mutant positions concordant with reference}) / (\# \text{ specimens} \times 56 \text{ mutant and non-mutant positions total}) = \text{OPA}$$
- 2 Positive Percent Agreement (PPA) is calculated as 100% times the number of true positives (mutant positions concordant with reference) divided by the sum of the number of true positives and the number of false negatives on a per mutation basis. Positive Percent Agreement was calculated as follows:

$$\# \text{ mutant positions} \times \# \text{ replicates} = \# \text{ potential mutant positions}$$

$$(\# \text{ true positives}) / (\# \text{ true positives} + \# \text{ false negatives}) = \text{PPA}$$
- 3 Negative Percent Agreement (NPA) is calculated as 100% times the number of true negatives (non-mutant positions concordant with reference) divided by the sum of the number of true negatives and the number of false positives. NPA is calculated on a per mutation basis; there are 56 mutations per sample. Negative Percent Agreement was calculated as follows:

$$(\# \text{ wild type specimens} \times \# \text{ replicates} \times 56 \text{ non-mutant positions}) + (\# \text{ mutant specimens} \times \# \text{ replicates} \times \# \text{ non-mutant positions}) = \# \text{ potential non-mutant positions}$$

$$(\# \text{ true negatives}) / (\# \text{ true negatives} + \# \text{ false positives}) = \text{NPA}$$
- 4 Percent Correct Call (PCC) is calculated as 100% times the number of correct calls divided by the number of calls attempted. This term is used for Reproducibility. The same calculation is described as percent agreement (positive or negative percent agreement) in other analytical studies.

Confidence Interval Calculations: One-sided 95% lower confidence bounds and 2-sided 95% confidence intervals were calculated using the Clopper-Pearson (exact binomial) method for analytical or clinical studies, or the Wilson Score method (where indicated) in clinical studies.

Analytical Accuracy – Comparison to an Orthogonal Method

Banked formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) colorectal cancer tissue samples collected during the Amgen panitumumab study (protocol no. 20050203 [T203 study]) were tested with the Praxis Extended RAS Panel. Samples were also evaluated using the reference method, bidirectional Sanger sequencing (Sanger). The agreements between results from Praxis Extended RAS Panel and Sanger were compared to evaluate the accuracy of the Praxis Extended RAS Panel.

Subject-level RAS status was positive if the subject had at least 1 mutation detected. Subject-level RAS status was negative if no mutation was detected. Positive Percent Agreement (PPA) is calculated as 100% times the number of true positive subjects divided by the sum of the number of true positive subjects and the number of false negative subjects. Negative Percent Agreement (NPA) is calculated as 100% times the number of true negative subjects divided by the sum of the number of true negative subjects and the number of false positive subjects. Two-sided 95% confidence intervals are calculated using the Clopper-Pearson (Exact binomial) method.

Of the 1183 subjects, the following were excluded from the accuracy analysis (combination of Sanger and Praxis Extended RAS Panel): 358 had no tissue available, 127 had insufficient tissue area, and 13 had insufficient neoplastic cells. Of the remaining 685 subjects, 214 were removed due to dCq > 5.0, 1 due to unestimable dCq, another 28 due to MiSeqDx QC failures, and lastly 1 subject was removed due to sample processing error/aborted run. The remaining 441 subjects had valid Sanger and Praxis Extended RAS Panel results, which were compared.

When evaluated at the subject level (Table 15), 230 of the 441 subjects were RAS positive by Sanger (mutation detected by Sanger); of these, 227 were RAS positive by the Praxis Extended RAS Panel. The remaining 211 of 441 subjects were RAS negative by Sanger (no mutation detected by Sanger); of these, 206 were RAS negative by the Praxis Extended RAS Panel. This resulted in a PPA of 98.7% and an NPA of 97.6%.

Table 15 Positive and Negative Percent Agreement of Subject-level RAS Results

Praxis Extended RAS Panel	Sanger		Total
	Positive	Negative	
Positive	227*	5	232
Negative	3**	206	209
Total	230	211	441

Performance Summary

Agreement Statistic	Point Estimate	Exact 95% CI
PPA	227/230 = 98.7%	[96.2%,99.7%]
NPA	206/211 = 97.6%	[94.6%,99.2%]

*There were 224 exact matches for within-subject, all mutation-level results; for 2 subjects, MiSeqDx detected the Sanger detected mutation and 1 additional mutation; for 1 subject, MiSeqDx and Sanger detected different mutations.

**1 subject had 2 mutations detected by Sanger; 2 subjects had 1 mutation detected by Sanger.

The data were also evaluated at the mutation level and designated true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP), and false negative (FN). The PPA and NPA are presented for each mutation along with a 95% Clopper-Pearson (Exact binomial) confidence interval in Table 16 and Table 17.

Table 10 Positive and Negative Percent Agreement of Mutation-level Results in the KRAS Gene (dCq ≤ 5.0)

Location	Mutation	TP	FN	FP	TN	Total	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)
KRAS Exon 2	c.34G>T	14	0	0	426	440	100.0 (76.8-100.0)	100.0 (99.1-100.0)
	c.34G>A	9	1	0	430	440	90.0 (55.5-99.7)	100.0 (99.1-100.0)
	c.34G>C	0	0	0	440	440	NE ¹	100.0 (99.2-100.0)
	c.34_35GG>TT	1	0	0	439	440	100.0 (2.5-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.34_35GG>AA	0	0	0	440	440	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.34_36GGT>TGG	0	0	0	440	440	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.35G>A	55	0	1	384	440	100.0 (93.5-100.0)	99.7 (98.6-100.0)
	c.35G>T	40	2	2	396	440	95.2 (83.8-99.4)	99.5 (98.2-99.9)
	c.35G>C	11	0	2	427	440	100.0 (71.5-100.0)	99.5 (98.3-99.9)
	c.37G>T	2	0	0	438	440	100.0 (15.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.37G>C	0	0	0	440	440	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.38G>A	41	0	0	399	440	100.0 (91.4-100.0)	100.0 (99.1-100.0)
	c.38_39GC>TT	0	0	0	440	440	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.38_39GC>AA	0	0	0	440	440	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.38_39GC>AT	0	0	0	440	440	NE	100.0 (99.2-100.0)
KRAS Exon 3	c.175G>A	1	0	0	440	441	100.0 (2.5-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.176C>G	1	0	0	440	441	100.0 (2.5-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.181C>A	0	1	0	440	441	0.0 (0.0-97.5)	100.0 (99.2-100.0)
	c.181C>G	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.182A>T	1	0	0	440	441	100.0 (2.5-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.182A>G	2	0	0	439	441	100.0 (15.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.183A>C	6	0	0	435	441	100.0 (54.1-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.183A>T	1	0	0	440	441	100.0 (2.5-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
KRAS Exon 4	c.351A>C	2	1	0	437	440	66.7 (9.4-99.2)	100.0 (99.2-100.0)
	c.351A>T	2	0	0	438	440	100.0 (15.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.436G>A	11	0	0	429	440	100.0 (71.5-100.0)	100.0 (99.1-100.0)
	c.436G>C	1	0	0	439	440	100.0 (2.5-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.437C>T	3	0	0	437	440	100.0 (29.2-100.0)	100.0 (99.2-100.0)

* NE = not estimable

Table 17 Positive and Negative Percent Agreement of Mutation-level Results in the NRAS Gene (dCq ≤ 5.0)

Location	Mutation	TP	FN	FP	TN	Total	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)
NRAS Exon 2	c.34G>T	1	0	1	439	441	100.0 (2.5-100.0)	99.8 (98.7-100.0)
	c.34G>A	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.34G>C	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.34_35GG>TT	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.34_35GG>AA	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.34_36GGT>TGG	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.35G>A	4	0	0	437	441	100.0 (39.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.35G>T	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.35G>C	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.37G>T	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.37G>C	2	0	0	439	441	100.0 (15.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.38G>A	0	0	1	440	441	NE	99.8 (98.7-100.0)
	c.38G>T	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.38_39GT>AA	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.38_39GT>AG	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
NRAS Exon 3	c.175G>A	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.176C>G	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.181C>A	7	0	1	433	441	100.0 (59.0-100.0)	99.8 (98.7-100.0)
	c.181C>G	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.182A>T	2	0	0	439	441	100.0 (15.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.182A>G	5	0	0	436	441	100.0 (47.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
	c.183A>C	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.183A>T	2	0	0	439	441	100.0 (15.8-100.0)	100.0 (99.2-100.0)
NRAS Exon 4	c.351G>C	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.351G>T	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.436G>A	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.436G>C	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)
	c.437C>T	0	0	0	441	441	NE	100.0 (99.2-100.0)

* NE = not estimable

Overall PPA and NPA calculated at the mutation level for each gene, and across both genes (total), are presented in Table 18. Two-sided 95% confidence intervals for PPA and NPA are calculated using the Clopper-Pearson (Exact binomial) method.

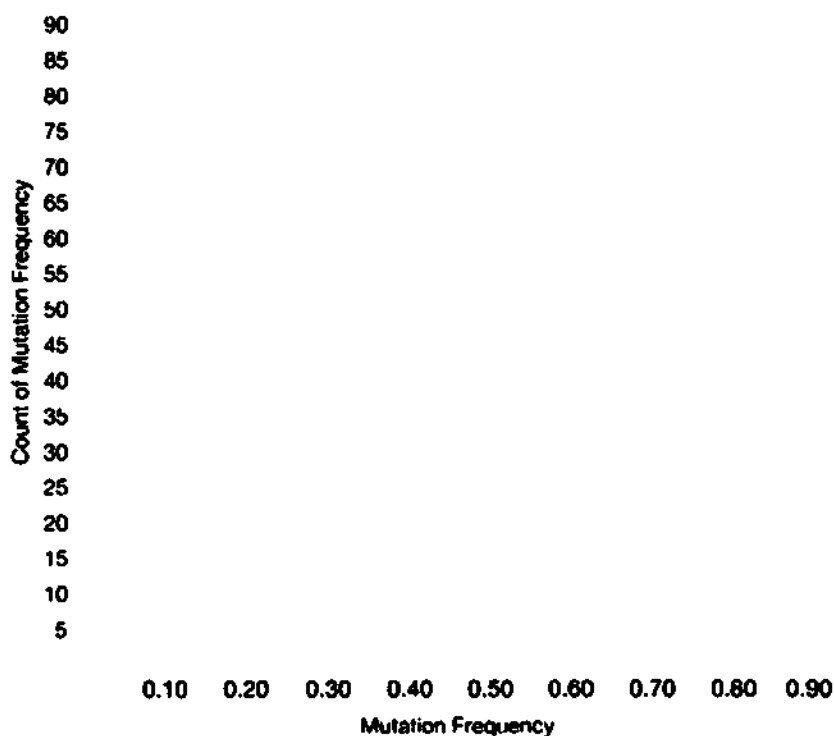
Table 18 Total Positive and Negative Percent Agreement of Mutation-Level Results

Location/ Mutation	TP	FN	FP	TN	Total	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)
KRAS/All	204	5	5	12114	12328	97.6 (94.5-99.2)	99.96 (99.9-100.0)
NRAS/All	23	0	3	12322	12348	100 (85.2-100.0)	99.98 (99.9-100.0)
Total	227	5	8	24436	24676	97.8 (95.0-99.3)	99.97 (99.9-100.0)

Figure 7 shows a distribution of the Praxis Extended RAS Panel mutation frequencies. Using ≥ 50% tumor content in the FFPE specimen, the distribution of mutation frequencies observed in the '203 study for samples that tested positive is demonstrated in Figure 7. The majority of specimens showed mutation

frequencies in the 0.15 to 0.35 range. There were 14.9% of subjects with mutation frequency < 0.15, and 55.3% of subjects with mutation frequency ≥ 0.15 and ≤ 0.35 .

Praxis Extended RAS Panel Mutation Frequency Distribution for Positive Samples (n=235)



A cross-tabulation of Praxis Extended RAS Panel and Sanger mutation-level results are summarized in the confusion table of Sanger and Praxis Extended RAS Panel Results (see Table 19). There were 445 possible comparisons between mutations reported by Sanger and/or Praxis Extended RAS Panel for the 441 evaluable subjects in the RAS Evaluable analysis set. Four (4) subjects had two mutations reported by Praxis Extended RAS Panel, by Sanger, or both methods; therefore, the number of mutation-level results (n=445) is greater than the number of subjects (n=441).

Counts along the diagonal in the table represent results that agree at the mutation level (both methods report the same mutation or both methods report no mutation detected). Counts off the diagonal represent results that disagree. Both methods agreed on most results (434/445, 97.5%); 206 of the results that agreed were reported as no mutation detected (negative). In the negative column for Sanger, there were 5 instances (FP) of mutations reported by the Praxis Extended RAS Panel (eg, 1 sample Sanger reported as no mutation, while the Praxis Extended RAS Panel reported KRAS Ex2 c35C>A). In the negative row for Praxis Extended RAS Panel, there were 4 instances (FN) of mutations reported for Sanger (eg, 1 sample RAS Panel reported as no mutation, while Sanger reported KRAS Ex2 c34C>A).

Results corresponding to the 4 subjects who had 2 mutations detected by Sanger and/or Praxis Extended RAS Panel are noted by footnotes in the confusion table shown in Table 19.

Confusion Table of Sanger and Praxis Extended RAS Panel Results

		SANGER																					Negative	Total						
		KRAS Exon 2					KRAS Exon 3					KRAS Exon 4					NRAS Exon 2					NRAS Exon 3								
Missequenced RAS Panel		c34G>T	c34G>A	c34,35GG>TT	c35G>A	c35G>T	c35G>C	c37G>T	c38G>A	c178G>A	c178C>G	c181C>A	c182A>T	c182A>G	c183A>C	c183A>T	c351A>C	c351A>T	c436G>A	c436G>C	c437C>T	c34G>T	c35G>A	c37G>C	c38G>A	c181C>A	c182A>T	c182A>G	c183A>T	Negative
		14 ³	9	1	55	40	11	22	41	1	0	1	2	6	1	1	1	2	2	11	1	3	1	4	2	0	7	2	5	2
	c34G>T	14 ³																												14
	c34G>A		9																											9
	c34,35GG>TT			1																										1
	c35G>A				55																									55
	c35G>T					40																								40
	c35G>C						11																							11
	c37G>T							22																						22
	c38G>A								41																					41
	c178G>A									1																				1
	c178C>G										0																			0
	c181C>A											1																		1
	c182A>T												2																	2
	c182A>G													6																6
	c183A>C														1															1
	c183A>T															2														2
	c351A>C																1													1
	c351A>T																	2												2
	c436G>A																		11											11
	c436G>C																			1										1
	c437C>T																				3									3
	c34G>T																													1
	c35G>A																													4
	c37G>C																													2
	c38G>A																													1
	c181C>A																													8
	c182A>T																													1
	c182A>G																													5
	c183A>T																													2
	Negative																													206
	Total	15	10	1	55	42	11	22	42	1	0	1	2	6	1	1	3	2	11	1	3	7	5	2					211	445

Footnoted results A, B, C and D indicate the 4 subjects who contributed two results to the cell counts in the table

Praxis Extended RAS Panel

^ASubject where Sanger reported 2 mutations (*KRAS* Exon 2 c.34G>A and *KRAS* Exon 2 c.35G>T) and Praxis Extended RAS Panel reported panel mutation not detected.

^BSubject where Sanger reported 1 mutation (*KRAS* Exon 2 c.34G>T) and Praxis Extended RAS Panel reported the same mutation and an additional mutation (*KRAS* Exon 2 c.34G>T and *KRAS* Exon 2 c.35G>C).

^CSubject where Sanger reported 1 mutation (*KRAS* Exon 2 c.38G>A) and Praxis Extended RAS Panel reported the same mutation and an additional mutation (*KRAS* Exon 2 c.38G>A and *KRAS* Exon 2 c.35G>T).

^DSubject where Sanger reported two mutations (*KRAS* Exon 2 c.38G>A and *NRAS* Exon 2 c.35G>A) and Praxis Extended RAS Panel reported the same two mutations (*KRAS* Exon 2 c.38G>A and *NRAS* Exon 2 c.35G>A).

Analytical Sensitivity (DNA Input Range)

The Praxis Extended RAS Panel workflow involves sample qualification, library preparation and sequencing. Genomic DNA specimens are qualified for use in the assay by measuring amplifiability of the specimen relative to a control DNA template through a real-time quantitative PCR (qPCR) reaction. Measuring amplifiability accounts for both the quantity and quality of the DNA specimen for qualification. A quantification threshold value (Cq) is generated using the Quality Control Template and each genomic DNA specimen. The metric to assess the amplifiability is the change in quantification threshold (Cq) between the specimen and the control template DNA (Delta Cq; dCq). The dCq value is used to determine whether a specimen qualifies for the Praxis Extended RAS Panel assay and is the measure of DNA quality and quantity (DNA Input) for this assay. The acceptable measure for the assay is a Delta Cq ≤ 5 .

DNA input was evaluated over the range of delta Cq values from -0.5 to 5 in order to evaluate assay performance. A Delta Cq level of -0.5 to 5 corresponds to approximately 1200 ng to 25 ng, respectively, of intact DNA used in the assay.

A panel of 9 CRC FFPE specimens each containing 1 unique Extended RAS panel mutation, and 1 CRC FFPE specimen wild type for Extended RAS panel mutations was evaluated. The mutations represented were in *KRAS* exons 2, 3, and 4 and *NRAS* exons 2 and 3. The mutation frequency for this panel ranged from approximately 10% to 20%.

The specimen panel was tested in duplicate library preparations at each DNA input level for a total of 20 observations at each DNA input level. Specimens were sequenced at the maximum multiplexing level of 10 samples plus controls per run. Two (2) DNA input levels were tested: 1) dCq -0.5 to 0.5 (nominal high end) 2) dCq 4 to 5 (nominal low end).

All specimens showed a valid result after library preparation and sequencing with a sample first pass rate of 100% (20/20) for each DNA input level. OPA, PPA, and NPA are calculated on a per mutation basis; there are 56 mutations per sample. The overall percent agreement relative to Sanger sequencing was 100% (1120/1120) for each DNA input level. The positive percent agreement was 100% (18/18) and negative percent agreement was 100% (1102/1102) for both DNA input levels relative to Sanger sequencing. Therefore, this study demonstrates the performance of the Praxis Extended RAS Panel assay for the delta Cq (DNA input) range of -0.5 to 5.

To demonstrate the performance with challenging samples that harbor mutations near the limit of detection (LoD) of the mutant allele frequency, an additional study was conducted. Since DNA is qualified based on a dCq cutoff of 5.0, a nominal DNA input concentration range (12.5ng to 50ng) corresponding to approximate values of dCq 6-4 was selected for evaluation. A panel of 5 blended CRC FFPE specimen mixes, each containing 2 unique representative Extended RAS panel mutations, one at a low (approximately 8%) and one at a high (approximately 14%) mutation frequency level, was used. Two (2) of the five (5) sample mixes were spiked with a RAS panel multinucleotide variant (MNV). Two DNA input levels were evaluated for each FFPE blend: a dCq level of 4-5 corresponds to approximately 50-25 ng, respectively, and a dCq level of 5-6 corresponds to approximately 25-12.5 ng, respectively, of intact DNA. Twelve (12) observations of each of the 5 specimen mixes were collected over 3 non-consecutive days per DNA Input/Delta Cq and mutation frequency level. The total number of observations for the study across all specimen mixes was 60 observations; there were 120 observations across all mutation frequency levels per DNA input level (2 observations $\times$ 2 instruments [sequencing runs] $\times$ 3 non-consecutive days $\times$ 5 mixes). The sample first pass rate was 100% (60/60) for dCq 4 to 5 and 91.7% (55/60) for dCq 5 to 6. For dCq 4 to 5, 100% (120/120) of observations showed the expected Extended RAS Panel mutation result. For dCq 5 to 6, 95% (114/120) of observations showed the expected Extended RAS Panel mutation result. Mean mutation frequencies were similar between Delta Cq levels, whereas specimens with Delta Cq 5 to 6 had more mutation frequency variability in general than the same specimens with Delta Cq 4 to 5. The study confirmed that the Praxis Extended RAS Panel is able to detect mutants with accuracy at DNA input corresponding to dCq ≤ 5.0 and approximately 25 ng of intact DNA for mutations near the LoD.

Analytical Sensitivity (Limit of Blank [LoB] and Limit of Detection [LoD])

LoD is defined as the minor allele frequency at which 95% of samples are reliably detected. The Limit of Blank (LoB) and the Limit of Detection (LoD) study for the Praxis Extended RAS Panel was conducted using 3 blended CRC FFPE specimen mixes, each containing 2 representative Extended RAS Panel mutations at 5 mutation frequency levels (approx. 10%, 5%, 2.5%, 1.25% and 0%). These mixes were run in duplicate with 2

different reagent lots by 5 operators on 2 nonconsecutive days for a total of 20 observations per specimen mix per lot. The total number of observations for the study across all levels, specimen mixes, and reagent lots is 600 observations (20 observations × 5 levels × 3 specimen mixes × 2 lots = 600 observations). All runs included 10 samples plus controls on a single flow cell to test the LoD at the assay sample throughput limits. The sample mixes were prepared at the low level of DNA input (dCq=4–5). The range of results for 95% detection of each mutation tested is shown in Table 20. Using Probit analysis, the LoD for the 6 representative mutations ranged between 4.2%–5.3% (Table 20). Overall, the data supports the claim of 5%.

Table 20 Limit of Detection

Gene	Exon	Mutation	LoD
KRAS	2	c.35 G>A	5.0%
NRAS	3	c.182 A>G	4.7%
KRAS	2	c.38 G>A	4.8%
KRAS	4	c.436 G>A	5.3%
KRAS	3	c.183 A>C	4.2%
NRAS	2	c.38_39 GT>AA	4.5%

The limit of blank (LoB) for each of the 56 mutations claimed by this assay was calculated using specimens wild type for RAS panel mutations. Three wild type (WT) specimens were used in this study. A total of 60 observations were generated per study mutation per lot (20 observations × 3 WT samples). Two lots were used in the study. No false positive calls were reported. There was one observation with mutation frequency above the threshold, but the mutation was only detected in one oligo pool and not confirmed in the other, and was therefore not reported. The clinical threshold is set at 2.6%.

Precision

Lot-to-Lot Precision

A Lot-to-Lot Precision study was conducted to evaluate the performance of the Praxis Extended RAS Panel across manufactured reagent kit lots. Three (3) reagent kit lots were tested using a panel of 5 blended CRC FFPE specimens. Each CRC FFPE specimen contained 2 unique representative Extended RAS panel mutations: one at a low (approximately 8%) mutation frequency level and one at a high (approximately 14%) mutation frequency level. Twelve (12) observations of each of the 5 specimen mixes were collected over 3 nonconsecutive days with 3 reagent kit lots. The total number of observations for the study across all reagent lots was 180 observations across all specimen mixes and 360 observations across all mutation frequency levels. Across all lots and days, 99.7% (359/360) of observations showed the expected Extended RAS Panel mutation result. One low frequency mutation was incorrectly called as wild type. A variance component analysis was performed for each of the mutations/mutation frequency levels to estimate the variability of the system. The total standard deviations ranged from 0.011 to 0.029. The reagent lot component of the total standard deviation ranged from 0 to 0.015.

Reproducibility

An external study was performed to assess the reproducibility of the Praxis Extended RAS Panel across 3 external testing sites (2 operators per site), 1 reagent lot, and 3 non-consecutive testing days. Testing was conducted with 6 well-characterized sample panels of genomic DNA samples from FFPE clinical specimens or cell lines. Each panel consisted of 10 members, for a total of 60 members across panels.

The 60 panel members consisted of duplicates of 4 unique wild type (for RAS panel mutations) specimens, 12 unique mutant specimens (with a single mutation) prepared at both high and low mutation frequency levels, and 2 unique mutant specimens (with a single mutation) prepared at a low mutation frequency level only. Each unique specimen/mutation frequency level sample (tested in duplicate in each run) had 36 possible results (2 replicates × 2 operators × 3 days × 3 sites) if all results were valid. The Delta Cq values for each of the reproducibility sample panel members ranged from 3.64 to 4.08.

Percent Correct Call (PCC) across mutations and wild types was evaluated by comparing the Praxis Extended RAS Panel result to the expected mutation result (expected mutation detected or not detected) in each sample. PCC is calculated as 100% times the number of correct calls divided by the number of calls attempted. Two-sided 95% confidence intervals are calculated using the Wilson score method.

Qualitative Reproducibility

Combining sites, sample pass rates were $\geq 94.7\%$ for the first run of the sample or in samples tested in runs that were valid on first pass. The mutation-level percent correct call (PCC) across mutations from all mutant samples was 99.6% (905/909) excluding failed sample data. The number of attempted calls across all 56 panel mutations (regardless of whether a detected mutation was expected or not) for all valid samples was 58,856 (56×1051). Out of these 58,856 mutation level observations, there were only 6 incidents where the observed and expected results were discordant; the mutation-level PCC across mutations and wild types from all samples combined was 99.99% (58,850/58,856).

Table 21 shows PCCs for each of the 26 unique mutant specimen/mutation frequency level samples (combining replicates across 2 panel members) and corresponding 95% 2-sided score CIs.

Table 21 Mutation-Level Percent Correct Call for Individual Unique Mutant Specimens/Mutation Frequency Level Samples (Evaluable Analysis Set)

Mutation Level	Exon	Amino Acid Change	Base Change	N	Percent Correct Call (%)	95% CI ¹
Low	KRAS exon 2	p.Gly12Cys	c.34G>T	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Gly12Arg	c.34G>C	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Gly12Ser	c.34G>A	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
		p.Gly12Ala	c.35G>C	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Gly12Val	c.35G>T	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
	KRAS exon 2(all samples)			249	249/249(100%)	(98.5, 100)
	KRAS exon 3	p.Gln61His	c.183A>C	33	33/33(100%)	(89.6, 100)
	KRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	35	33/35(94.3%)	(81.4, 98.4)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
	KRAS exon 4(all samples)			71	69/71(97.2%)	(90.3, 99.2)
	KRAS(all exons)			353	351/353(99.4%)	(98, 99.8)
	NRAS exon 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	31	31/31(100%)	(89, 100)
	NRAS exon 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	33	33/33(100%)	(89.6, 100)
	NRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	34/35(97.1%)	(85.5, 99.5)
	NRAS exon 4(all samples)			70	69/70(98.6%)	(92.3, 99.7)
	NRAS(all exons)			134	133/134(99.3%)	(95.9, 99.9)
	RAS(all exons)			487	484/487(99.4%)	(98.2, 99.8)
High	KRAS exon 2	p.Gly12Arg	c.34G>C	33	33/33(100%)	(89.6, 100)

Mutation Level	Exon	Amino Acid Change	Base Change	N	Percent Correct Call (%)	95% CI ¹
		p.Gly12Ala	c.35G>C	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Gly12Val	c.35G>T	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
	KRAS exon 2(all samples)			176	176/176(100%)	(97.9, 100)
	KRAS exon 3	p.Gln61His	c.183A>C	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
	KRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
	KRAS exon 4(all samples)			71	71/71(100%)	(94.9, 100)
	KRAS(all exons)			282	282/282(100%)	(98.7, 100)
	NRAS exon 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	34	34/34(100%)	(89.8, 100)
	NRAS exon 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	34	34/34(100%)	(89.8, 100)
	NRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	36	35/36(97.2%)	(85.8, 99.5)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
	NRAS exon 4(all samples)			72	71/72(98.6%)	(92.5, 99.8)
	NRAS(all exons)			140	139/140(99.3%)	(96.1, 99.9)
	RAS(all exons)			422	421/422(99.8%)	(98.7, 100)
Overall	All panel mutations			909	905/909(99.6%)	(98.9, 99.8)

^[1] 95% two-sided confidence interval calculated using the Wilson score method.

Table 20 Sample-Level Percent Correct Call Across Wild Type Samples (Evaluable Analysis Set)

Sample	N	Percent Correct Call (%)	95% CI ¹
Wild Type 1	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
Wild Type 2	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
Wild Type 3	36	36/36(100%)	(90.4, 100)
Wild Type 4	35	35/35(100%)	(90.1, 100)
Overall	142	142/142(100%)	(97.4, 100)

^[1] 95% two-sided confidence interval calculated using the Wilson score method.

Table 23 shows the variance component analysis of mutation frequency results for each source of variation and total variation for the Evaluable analysis set (for mutation frequency). Results are shown for each unique mutant specimen/mutation frequency level sample, combining sites.

Table 23: Variance Component Estimates for Individual Mutant Specimen and Mutation Level (Evaluable Analysis Set for Mutation Frequency)

Mutation Level	Exon	Amino Acid Change	Base Change	N	Mean Mutation Frequency	Site SD (%CV)	Operator (Site) SD (%CV)	Day(Site, Operator) SD (%CV)	Replicate SD (%CV)	Total SD (%CV)
Low	KRAS exon 2	p.Gly12Cys	c.34G>T	36	0.080	0.003 (4.0)	0.003 (4.0)	0.000 (0.0)	0.009 (10.8)	0.010 (12.2)
		p.Gly12Arg	c.34G>C	36	0.078	0.020 (25.2)	0.004 (5.3)	0.005 (6.6)	0.008 (9.8)	0.022 (28.3)
		p.Gly12Ser	c.34G>A	35	0.080	0.005 (6.1)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.011 (13.9)	0.012 (15.2)
		p.Gly12Ala	c.35G>C	35	0.072	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.010 (13.8)	0.013 (17.5)	0.016 (22.2)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	0.072	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.002 (3.4)	0.013 (18.7)	0.014 (19.0)
		p.Gly12Val	c.35G>T	36	0.083	0.002 (3.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.009 (11.1)	0.010 (11.5)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	35	0.092	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.015 (16.7)	0.017 (18.9)	0.023 (25.3)
	KRAS exon 3	p.Gln61His	c.183A>C	33	0.086	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.011 (12.9)	0.011 (12.9)
	KRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	33	0.090	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.003 (3.1)	0.010 (10.7)	0.010 (11.2)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	0.099	0.005 (4.8)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.009 (9.4)	0.010 (10.6)
	NRAS exon 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	31	0.078	0.002 (2.9)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.009 (12.1)	0.010 (12.4)
	NRAS exon 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	33	0.097	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.002 (1.8)	0.009 (9.5)	0.009 (9.6)
	NRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	35	0.086	0.001 (1.7)	0.002 (2.4)	0.003 (3.9)	0.007 (8.4)	0.008 (9.7)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	0.080	0.006 (6.9)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.016 (20.5)	0.017 (21.7)
High	KRAS exon 2	p.Gly12Arg	c.34G>C	33	0.230	0.047 (20.4)	0.004 (1.7)	0.000 (0.0)	0.019 (8.1)	0.051 (22.1)

Mutation Level	Exon	Amino Acid Change	Base Change	N	Mean Mutation Frequency	Site SD (%CV)	Operator (Site) SD (%CV)	Day(Site, Operator) SD (%CV)	Replicate SD (%CV)	Total SD (%CV)
High	KRAS exon 2	p.Gly12Ala	c.35G>C	36	0.281	0.009 (3.3)	0.000 (0.0)	0.008 (2.9)	0.013 (4.7)	0.018 (6.5)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	0.259	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.005 (2.0)	0.015 (5.8)	0.016 (6.2)
		p.Gly12Val	c.35G>T	35	0.206	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.020 (9.9)	0.020 (9.9)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	36	0.263	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.024 (9.3)	0.024 (9.3)
	KRAS exon 3	p.Gln61His	c.183A>C	35	0.259	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.013 (5.0)	0.013 (5.0)
	KRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	36	0.267	0.008 (3.0)	0.007 (2.6)	0.003 (1.2)	0.014 (5.3)	0.018 (6.7)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	0.277	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.015 (5.6)	0.015 (5.6)
	NRAS exon 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	34	0.274	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.013 (4.8)	0.013 (4.8)
	NRAS exon 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	34	0.281	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.012 (4.3)	0.012 (4.3)
	NRAS exon 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	36	0.258	0.010 (3.9)	0.010 (3.7)	0.012 (4.5)	0.045 (17.3)	0.048 (18.7)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	0.258	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.014 (5.6)	0.014 (5.6)

Analytical Specificity (Interfering Substances)

An Interfering Substances study was conducted to evaluate the impact of potentially interfering substances on the performance of the Praxis Extended RAS Panel Assay. Assay performance was evaluated in the presence of exogenous substances, (paraffin wax, xylene, ethanol and Proteinase K, extraction solutions), as well as endogenous substances (necrotic tissue and hemoglobin).

Exogenous Substances

The exogenous substances tested are extraction solutions commonly used during the DNA extraction process and are listed with tested quantities in Table 24. Fifteen (15) colorectal FFPE specimens were tested per interfering substance and compared with untreated controls. The specimens represented wild type specimens containing no Extended RAS panel mutations (5/15 specimens), as well as specimens containing prevalent Extended RAS panel mutations (10/15 specimens). Specimens were sequenced at the maximum multiplexing level of 10 samples plus controls per run.

Substances Tested

Interfering Substance	Actual Amount [ul/25uL eluate]
Deparaffinization Solution	1.69×10^{-04}
Paraffin Wax (in Xylene)	2.50×10^{-05}
Xylene	2.50×10^{-05}
Ethanol	1.69×10^{-04}
Proteinase K	3.30×10^{-06}
Wash Solution, N	6.25×10^{-01}
1X Wash Solution, P	6.25×10^{-01}
Wash Buffer AW1	6.25×10^{-02}
Wash Buffer AW2	6.25×10^{-01}

For all exogenous substances tested, all 15 specimens passed the sample qualification requirement (15/15, 100% Sample QC Pass Rate) and showed a valid result after library preparation and sequencing (15/15, 100% Sample First Pass Rate).

OPA, PPA, and NPA are calculated on a per mutation basis; there are 56 mutations per sample. All 15 specimens for all 9 exogenous substances showed agreement with the untreated control condition at all mutant and non-mutant positions. No false positives and no false negatives were observed. None of the potentially interfering substances evaluated at the maximum concentrations expected to be encountered in the process of genomic DNA (gDNA) extraction from FFPE tissue impacts performance of the Praxis Extended RAS Panel Assay.

Endogenous substances (Hemoglobin)

Fifteen (15) CRC FFPE specimens were each tested in the presence or absence of 2 mg/mL hemoglobin, a CLSI "high" amount of hemoglobin. The specimens represented wild type specimens containing no Extended RAS panel mutations (5/15 specimens), as well as specimens containing prevalent Extended RAS Panel mutations (10/15 specimens). Specimens were sequenced at the maximum multiplexing level of 10 samples plus controls per run. All 15 specimens passed the sample qualification requirement (15/15, 100% Sample QC Pass Rate) and showed a valid result after library preparation and sequencing (15/15, 100% Sample First Pass Rate). All 15 specimens showed agreement at all mutant and non-mutant positions with the untreated control condition. No false positives or false negatives were observed. The concentration of hemoglobin tested does not affect performance of the Praxis Extended RAS Panel.

Necrotic tissue

Fifteen (15) CRC FFPE specimens composed of wild type specimens containing no Extended RAS panel mutations (10/15 specimens), as well as specimens containing prevalent Extended RAS Panel mutations (5/15 specimens) and between 10–80% necrotic tissue as determined by pathology review, were utilized for evaluation of endogenous necrotic specimens. Specimens were sequenced at the maximum multiplexing level of 10 samples plus controls per

Praxis Extended RAS Panel

run. 14/15 specimens gave a valid result after library preparation and sequencing (93.3% Sample First Pass Rate). The overall percent agreement was 99.9% (783/784) relative to Sanger sequencing. PPA was 100% (4/4) and NPA was 99.9% (779/780). The 1 false positive detected was likely due to a mutation frequency below the limit of detection of Sanger sequencing. Overall, the Praxis Extended RAS Panel meets performance characteristics with tissue containing 10–80% necrosis.

Guard banding Studies

The Praxis Extended RAS Panel workflow guard banding studies evaluated selected workflow steps of Sample Qualification, Library Preparation, and Sequencing. Test samples included FFPE genomic DNA and cell line genomic DNA to increase mutation diversity. The Library preparation conditions were tested at the maximum multiplexing level of the assay at 10 specimens per run.

Sample Qualification (qPCR step)

Five genomic DNA samples were tested at various storage times of qPCR master mix and reaction mix. Since both the qPCR master mix and reaction mix are used right away, the testing conditions included holding the qPCR master mix at room temperature for 1 hour in ambient light, and the reaction mix for 10 minutes on ice. Average dCq differences of less than 0.25 were observed indicating stability of the qPCR master mix and reaction mixes.

Library Preparation

Hybridization and Extension-Ligation incubation times and temperatures were tested at approximately +/- 5% of the specified value. 100% of specimen tested showed a valid result with the expected mutations.

During PCR Amplification, sodium hydroxide is used to remove the extension-ligation product from the filter plate. The concentration and incubation times were tested at approximately +/- 5% of the specified value. 90% of specimens tested at low sodium hydroxide concentration and 100% of specimen tested at all other conditions showed a valid result with the expected mutations.

Storage times of PCR working solution and hold times of the PCR plate (post-amplification) were tested at approximately +/- 5% of the specified value. All specimens tested at all conditions showed a valid result with the expected mutations.

For the PCR clean-up and Library Normalization steps, the following conditions were tested at approximately +/- 5% of the specified value: a) incubation times, b) shaking times, and concentrations of c) ethanol (PCR clean-up), d) sodium hydroxide solution (Library Normalization). 90% of specimens tested for the longer PCR clean up elution incubation and 100% of specimens tested at all other conditions showed a valid result with the expected mutations.

For the Library Pooling step, times for heat denaturation and cooling were tested at approximately +/- 5% of the specified values. 90% of specimens tested at the longer cooling, and 100% of specimens tested at all other heat denaturation and cooling conditions showed a valid result with the expected mutations.

DAL (Diluted Amplicon Library) storage was tested up to 84 days (stored at -20°C). 100% of specimens tested showed a valid result with the expected mutations.

Sequencing

Robustness of deep sequencing is achieved with a minimum sequencing depth requirement for the samples to be called "valid". A total of 40 specimens plus controls were tested by 2 operators for meeting the minimum coverage of 1800X across both pools (900x per pool) per sample at the maximum multiplexing level of the assay at 10 specimens per run. All specimens met the minimum coverage requirement with an average coverage of approximately 31000x across both pools per sample.

Stability

Real-Time Stability

The objective of the real-time stability study was to establish the shelf life of the Praxis Extended RAS Panel kit by evaluating the product throughout the proposed shelf life when stored per label conditions. The study design was based on the testing of three Praxis Extended RAS Panel kit lots and utilized the classic stability study design described in CLSI EP25-A. The kits were stored in its final kitted configuration for the duration of the study, at storage conditions defined on the product label. Frozen kit components were stored at -15°C to -25°C. Refrigerated kit components were stored at 2°C to 8°C. Room-temperature components were stored at 15°C to 30°C. Each kit has the appropriate expiry date printed on the box level label.

Open-Tube Stability

The open-tube, in-use stability of the sample qualification and library preparation reagents was evaluated under standard use conditions. The reagents are expected to be used two (2) times which corresponds to opened tubes for the room temperature and 2°C to 8°C components and two (2) freeze/thaw cycles for the reagents stored between -15°C and -25°C. The frozen reagents were subjected to 5 and 6 freeze/thaw cycles between execution control testing and final testing. Room temperature and 2°C to 8°C components were tested under the standard use conditions per label requirements for two separate library preparations with opened reagents closed and returned to their indicated storage conditions between uses. The study showed that all quality control acceptance criteria were met for all kits tested, both in the execution tests and after the freeze/thaw cycles.

Summary of Analytical Studies

When evaluated at the specimen level at external sites using study specimens, and after exclusion of Praxis invalids, the Praxis Extended RAS Panel demonstrated a PPA of 98.7% (227/230) and an NPA of 97.6% (206/211), as compared to Sanger.

The Praxis Extended RAS Panel can detect 56 mutations () in the KRAS and NRAS genes. The performance of the Praxis Extended RAS Panel assay was demonstrated for the delta Cq (DNA input) range of -0.5 to 5. The LoD for each mutation tested ranged from 4.2% to 5.3%. Assay performance was not negatively impacted by interfering substances and necrotic tissue. No false positive results were detected due to well-to-well or run-to-run sample carryover. Precision and reproducibility of assay performance was demonstrated across multiple sources of variation with minimal contribution of reagent lot and other factors to overall variability.

References

- 1 Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol*. 2015 Jan;26(1):13-21.
- 2 Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *J Mol Diagn* 2017;19:187-225.
- 3 Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 May;50(5):307-12.
- 4 US NCCN Guidelines: Colon Cancer V.1.2017.

Patents and Trademarks

This document and its contents are proprietary to Illumina, Inc. and its affiliates ("Illumina"), and are intended solely for the contractual use of its customer in connection with the use of the product(s) described herein and for no other purpose. This document and its contents shall not be used or distributed for any other purpose and/or otherwise communicated, disclosed, or reproduced in any way whatsoever without the prior written consent of Illumina. Illumina does not convey any license under its patent, trademark, copyright, or common-law rights nor similar rights of any third parties by this document.

The instructions in this document must be strictly and explicitly followed by qualified and properly trained personnel in order to ensure the proper and safe use of the product(s) described herein. All of the contents of this document must be fully read and understood prior to using such product(s).

FAILURE TO COMPLETELY READ AND EXPLICITLY FOLLOW ALL OF THE INSTRUCTIONS CONTAINED HEREIN MAY RESULT IN DAMAGE TO THE PRODUCT(S), INJURY TO PERSONS, INCLUDING TO USERS OR OTHERS, AND DAMAGE TO OTHER PROPERTY.

ILLUMINA DOES NOT ASSUME ANY LIABILITY ARISING OUT OF THE IMPROPER USE OF THE PRODUCT(S) DESCRIBED HEREIN (INCLUDING PARTS THEREOF OR SOFTWARE).

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, Genetic Energy, MiSeqDx, Powered by Illumina, Praxis, TruSeq, and the streaming bases design are registered or pending trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

This product may be used as a component of human molecular diagnostic assays where applicable country laws allow. This product by itself does not provide any diagnostic result. This product includes GoTaq® Hot Start Polymerase manufactured by Promega Corporation for distribution by Illumina, Inc. Licensed to Promega Corporation under U.S. Patent Nos. 5,338,671 and 5,587,287 and their corresponding foreign patents.



NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in the field of quality assurance and quality control for products and processes in the In Vitro Human Diagnostics Field, including, without limitation, conformance with specifications, purity and batch-to-batch consistency and including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

Contact Information



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (outside North America)
techsupport@illumina.com



Illumina

**Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для
качественного определения статуса специфических
мутаций генов RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS
(экзоны 2, 3 и 4) методом секвенирования нового поколения
в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов
тканей колоректального рака, фиксированных в
формалине, и заключенных в парафиновые блоки**

Инструкция по применению

Производитель:

«Иллюмина, Инк.»
(Illumina, Inc.)

Адрес:

5200 Иллюмина Уэй, Сан-Диего, Калифорния 92122, США
(5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Утверждено

Со стороны Иллюмина, Инк.

/подпись/

Аурелия Браунридж
Главный специалист нормативно-правового отдела
Illumina, Inc.

Дата: 14 мая 2020 г



МАРИ АГОСТИНО
Нотариус штата Калифорния
Округ Сан-Диего
Лицензия нотариуса № 2282380
и Срок моих полномочий истекает
23 марта 2023 г

НОТАРИАЛЬНОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

Государственный нотариус или другое должностное лицо, заполняющее настоящий сертификат, подтверждает только личность физического лица, подписавшего документ, к которому приложен настоящий сертификат, но не отвечает за достоверность, точность или действительность такого документа.

Штат Калифорния

Округ Сан-Диего)

14 мая 2020 г. в моем присутствии, Мари Агостино, нотариуса
(вставить ФИО и должность должностного лица)

Аурелиа Браунридж лично

подтвердила на основании убедительных доказательств, что она является лицом, чьим именем подписан документ, и заверила меня, что она подписала его в силу имеющихся у нее полномочий, а также, что проставлением ее подписи на документе физическое или юридическое лицо, от имени которого лицо действовало, исполнило данный документ.

ОСОЗНАВАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ, в соответствии с законодательством Штата Калифорния, я подтверждаю, что вышеизложенная информация является верной.

УДОСТОВЕРЯЮ СОБСТВЕННОРУЧНОЙ ПОДПИСЬЮ И ОФИЦИАЛЬНОЙ ПЕЧАТЬЮ



МАРИ АГОСТИНО
Нотариус штата Калифорния
Округ Сан-Диего
Лицензия нотариуса № 2282380
«Срок моих полномочий истекает
23 марта 2023 г.»

Подпись _____ /подпись/ _____ (Печать)

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel

для ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

№ по каталогу 20012431: 2 прогона, до 10 образцов с 2 контрольными образцами на один прогон/20 образцов на один набор

Назначение

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel представляет собой набор для качественного определения статуса 56 специфических мутаций генов RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака (CRC), фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (FFPE) для диагностики *in vitro*. Этот набор предусмотрен для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx компании Иллюмина (Illumina).

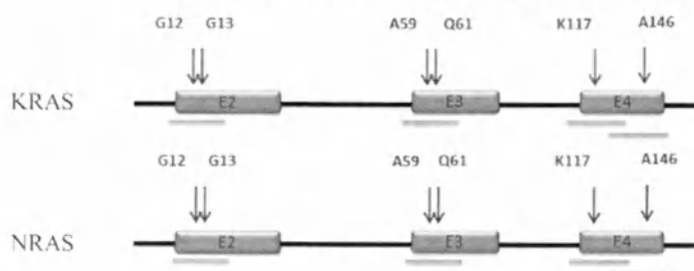
Краткое описание и пояснения к анализу

Клиническое описание

В злокачественных новообразованиях у человека часто обнаруживают мутации в онкогенах RAS. Эти мутации активируют сигнальный путь митоген-активирующей протеинкиназы, приводящий к формированию злокачественного фенотипа. Ранее было установлено, что мутации в экзоне 2 гена *KRAS* (кодон 12 и 13) являются прогностическим биомаркером резистентности к анти-EGFR (нацеленной на рецептор эпидермального фактора роста) терапии метастатического колоректального рака (mCRC). Позднее в многочисленных клинических исследованиях был установлен объем расширенного тестирования RAS с включением экзона 2 (кодоны 12 и 13), экзона 3 (кодоны 59 и 61) и экзона 4 (кодоны 117 и 146) генов *KRAS* или *NRAS*.¹ В целом расширенная группа мутаций RAS (экзоны 3, 4 *KRAS* и экзоны 2, 3, 4 *NRAS*) встречается у 11% пациентов с mCRC.¹ В совокупности, мутации в *NRAS* и *KRAS* могут выявляться у 53% пациентов.^{1,2,3}

Мутации RAS в панели

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel представляет собой набор для диагностики *in vitro*, используемый при обнаружении специфичных мутаций в экзонах 2, 3 и 4 *KRAS* и *NRAS*. На рисунке 1 показана локализация мутаций в пределах экзонов этих генов. Изменения кодонов, отмеченных красными стрелками, это мутации, на выявление которых нацелен анализ.

Гены RAS (*KRAS* и *NRAS*) и целевое секвенирование

Обозначения — Покрытие ампликонов
 : Покрытые экзоны

Данный набор реагентов специально разработан для обнаружения мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*, перечень которых представлен в таблице 1. Набор позволяет одновременно определять наличие или отсутствие каждой из 56 мутаций в каждом из секвенируемых образцов.

Сводный перечень мутаций, исследуемых с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel*

Хромосома	Ген	Экзон	Аминокислота	Дикий тип > мутация
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly13Val	c.38_39GC>TT
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly13Glu	c.38_39GC>AA
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly13Asp	c.38_39GC>AT
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly13Asp	c.38G>A
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly13Cys	c.37G>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly13Arg	c.37G>C
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Trp	c.34_36GGT>TGG
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Ala	c.35G>C
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Asp	c.35G>A
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Phe	c.34_35GG>TT
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Asn	c.34_35GG>AA
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Val	c.35G>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Ser	c.34G>A
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Cys	c.34G>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	2	p.Gly12Arg	c.34G>C
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Gln61His	c.183A>C
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Gln61His	c.183A>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Gln61Leu	c.182A>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Gln61Arg	c.182A>G
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Gln61Lys	c.181C>A
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Gln61Glu	c.181C>G

Хромосома	Ген	Экзон	Аминокислота	Диккий тип > мутация
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Ala59Gly	c.176C>G
хр. 12	<i>KRAS</i>	3	p.Ala59Thr	c.175G>A
хр. 12	<i>KRAS</i>	4	p.Ala146Val	c.437C>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	4	p.Ala146Thr	c.436G>A
хр. 12	<i>KRAS</i>	4	p.Ala146Pro	c.436G>C
хр. 12	<i>KRAS</i>	4	p.Lys117Asn	c.351A>T
хр. 12	<i>KRAS</i>	4	p.Lys117Asn	c.351A>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly13Glu	c.38_39GT>AG
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly13Glu	c.38_39GT>AA
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly13Asp	c.38G>A
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly13Val	c.38G>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly13Cys	c.37G>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly13Arg	c.37G>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Trp	c.34_36GGT>TGG
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Ala	c.35G>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Val	c.35G>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Asp	c.35G>A
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Phe	c.34_35GG>TT
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Asn	c.34_35GG>AA
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Ser	c.34G>A
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Cys	c.34G>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	2	p.Gly12Arg	c.34G>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Gln61His	c.183A>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Gln61His	c.183A>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Gln61Arg	c.182A>G
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Gln61Leu	c.182A>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Gln61Lys	c.181C>A
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Gln61Glu	c.181C>G
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Ala59Gly	c.176C>G
хр. 1	<i>NRAS</i>	3	p.Ala59Thr	c.175G>A
хр. 1	<i>NRAS</i>	4	p.Ala146Val	c.437C>T
хр. 1	<i>NRAS</i>	4	p.Ala146Thr	c.436G>A
хр. 1	<i>NRAS</i>	4	p.Ala146Pro	c.436G>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	4	p.Lys117Asn	c.351G>C
хр. 1	<i>NRAS</i>	4	p.Lys117Asn	c.351G>T

* Протоонкоген *KRAS*. ГТФаза [Homo sapiens (человек)] (идентификационный номер (ИД) гена: 3845) - NM_004985.4, NP_004976.2.

* Гомолог вирусного онкогена RAS нейробластомы *NRAS* [Homo sapiens (человек)] (ИД гена: 4893) - NM_002524.4, NP_002515.1.

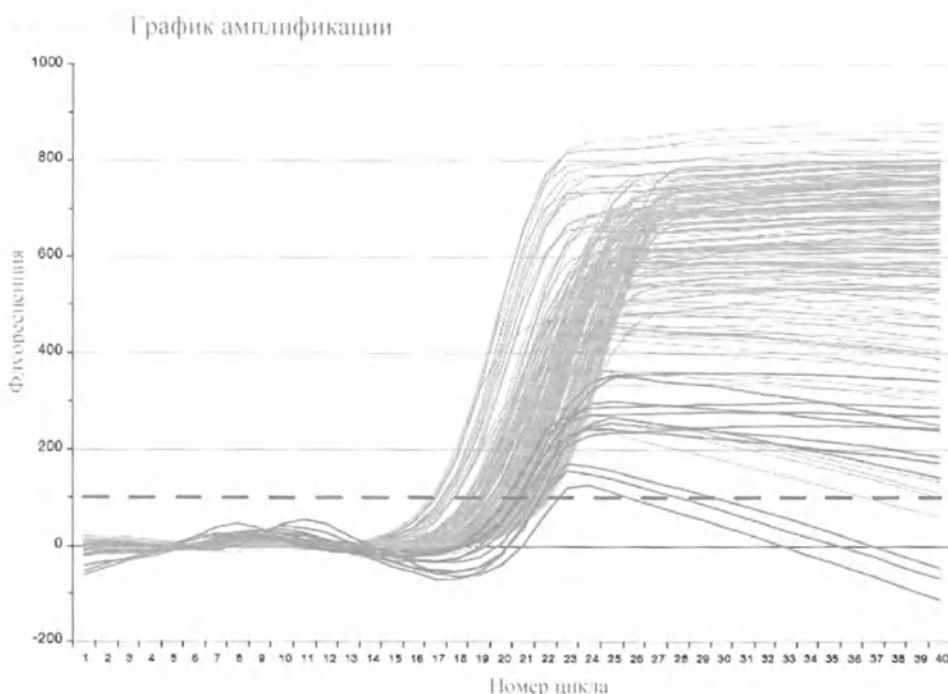
Тестирование на наличие мутаций *KRAS* и *NRAS* рекомендовано Руководством Национальной сети многопрофильных онкологических учреждений США (NCCN)[®] для всех пациентов с mCRC. Анти-EGFR терапии подлежат только пациенты с генами RAS дикого типа⁴.

Принципы метода

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel включает в себя три основных методики. Первая из них состоит в оценке качества образца ДНК, который будет использоваться в анализе (рисунок 2). Вторая — это приготовление образцов для секвенирования вручную — собственно приготовление библиотеки. Приготовление библиотеки состоит из четырех основных стадий: гибридизация, элонгация-лигирование, амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и нормализация библиотеки (рисунок 3). Третья методика заключается в секвенировании подготовленного образца с использованием химического метода секвенирования путем синтеза (от SBS - sequencing by synthesis) на генетическом секвенаторе MiSeqDx.

Оценка качества образцов FFPE

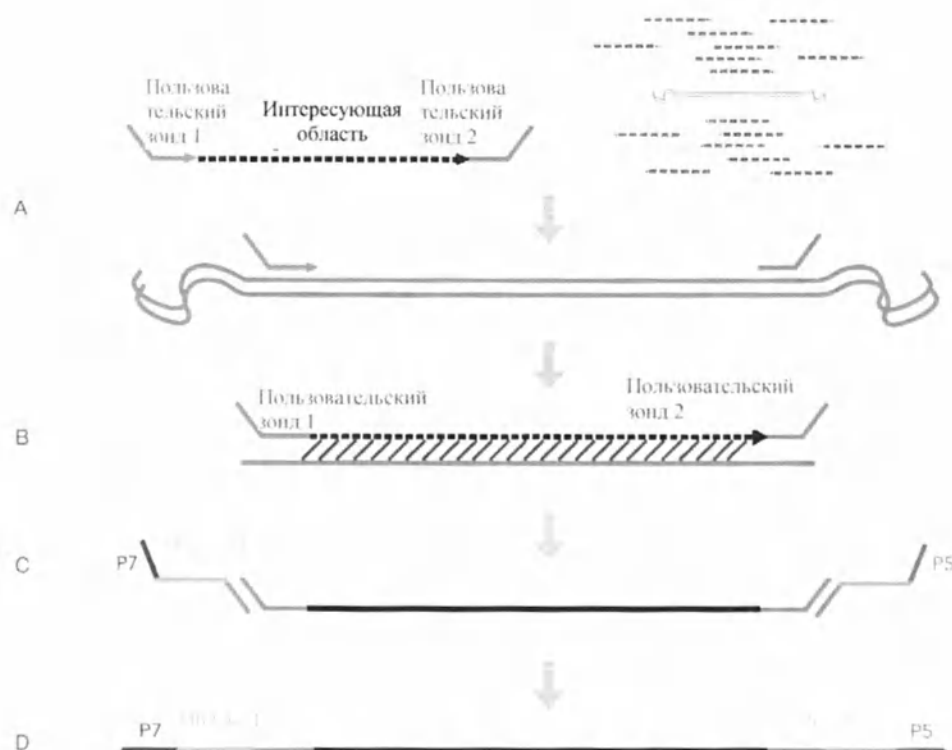
Последовательность действий по проведению анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel начинается со стадии оценки качества ДНК, которую выполняют, чтобы определить, является ли степень качества ДНК достаточной для дальнейшего этапа подготовки библиотек. Качество образцов геномной ДНК оценивают путем количественного определения возможности амплификации относительно контрольной ДНК-матрицы.



Приготовление библиотеки

Процесс приготовления библиотеки

Два пула праймеров, на каждую из цепочек ДНК



A Гибридизация — пул праймеров, специфичных к последовательностям, расположенным выше и ниже по последовательности от целевой области, которую анализируют с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel, гибридизуют с образцом геномной ДНК. Два пула праймеров (А и В) позволяют независимо амплифицировать каждую нить ДНК. По окончании этого процесса выполняют трехступенчатую процедуру селекции по размеру - отмывки на фильтре, с помощью которого происходит выборочное удаление несвязавшихся праймеров.

В Элонгация-лигирование — на второй стадии элонгации-лигирования происходит соединение гибридизованных праймеров, расположенных выше и ниже по последовательности. ДНК-полимераза осуществляет элонгацию вдоль всей целевой области, начиная с праймеров, расположенных выше по последовательности, а затем ДНК-лигаза осуществляет лигирование с 5'-концом праймеров, расположенных ниже по последовательности. В результате образуются продукты, содержащие RAS-специфичные праймеры и фланкируемые ими последовательности, предназначенные для амплификации.

С Амплификация методом ПЦР — на третьей стадии происходит амплификация продуктов элонгации-лигирования методом ПЦР, при этом используются праймеры, которые присоединяют индексные последовательности для мультиплексирования образцов, а также общие адаптеры, необходимые для образования кластеров на ячейке в процессе секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx. По окончании данного процесса проводят очистку ПЦР-продуктов (библиотеки).

Д Нормализация библиотеки — на последней стадии происходит нормализация количества каждого варианта библиотеки, обеспечивая таким образом более равномерную представленность каждого варианта библиотеки в конечном объединенном образце. По окончании этого процесса объединенную библиотеку загружают в генетический секвенатор MiSeqDx для секвенирования методом SBS.

Секвенирование

В основе химии SBS для определения отдельных нуклеотидов лежит метод обратимой терминации, которая происходит по мере включения нуклеотидов в растущие цепи ДНК. В ходе каждого цикла секвенирования к

цепи нуклеиновой кислоты присоединяется один дезоксирибонуклеотидтрифосфат (dNTP), меченный флуоресцентной меткой. Нуклеотидная метка выполняет функцию терминатора полимеризации, поэтому после включения каждого dNTP флуоресцентный краситель фиксируется – снимается на камеру и представляется в качестве изображения, что позволяет идентифицировать нуклеотид, и затем ферментативно отщепляется для включения следующего нуклеотида. Поскольку все четыре dNTP (A, G, T, C), связанные с обратимым терминатором, находятся в форме отдельных изолированных молекул, ошибки включения сводятся к минимуму за счет естественной конкуренции. Определение нуклеотидов происходит непосредственно на основании измерений интенсивности сигнала в ходе каждого цикла секвенирования. В результате осуществляется секвенирование основ за основанием.

Анализ данных

Определение нуклеотидов, полученное в ходе основного анализа, осуществляет модуль для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel программного обеспечения Local Run Manager, который обрабатывает и предоставляет информацию о каждом образце, что называется вторичным анализом. Вторичный анализ включает демультиплексирование, создание файла FASTQ, выравнивание, определение вариантов и создание отчета.

Демультиплексирование — это первая стадия вторичного анализа. Демультиплексирование разделяет данные, полученные для объединенных образцов, на основании уникальных индексов последовательности, которые были присоединены на стадии ПЦР амплификации.

Создание файла FASTQ — после демультиплексирования модуль набора реагентов Praxis Extended RAS Panel создает промежуточные файлы в формате FASTQ, которые представляют собой текстовый формат, используемый для отображения последовательностей. Файлы FASTQ содержат результаты для каждого образца и оценки качества в баллах, за исключением данных тех кластеров, которые не прошли через фильтр.

Выравнивание — выравнивание означает сравнение последовательностей с референсным образцом для идентификации сходства между последовательностями и присвоение оценки в баллах, основанной на областях подобию. Выровненные прочтения записываются в файлы в формате BAM. В программе Local Run Manager используется привязанный алгоритм Смита-Уотермана, который выполняет локальные выравнивания последовательностей для определения областей подобию между двумя последовательностями.

Определение вариантов — определитель соматических вариантов, разработанный компанией «Иллюмина» (Illumina), идентифицирует мутации, присутствующие в образце ДНК с низкой частотой. Чтобы свести к минимуму количество ложно положительных результатов за счет артефактов FFPE, мутации сначала определяют для каждого пула в отдельности. Затем проводится сравнение мутаций из двух пулов и их объединение в одном выходном файле. Если мутации обнаружены, в отчете указывают только мутации, перечень которых приведен в таблице 1. Дополнительную информацию см. в документе *Справочное руководство Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (документ № 1000000037191)*.

Создание отчета — результаты цикла секвенирования отображаются в таблице «Образцы и результаты» в программе Local Run Manager, которая создает следующий выходной файл в формате простого текста:

Отчет об анализе данных полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel — в этом отчете для каждого образца указано, содержание мутаций по приведенному перечню панели сравнения.

Ограничения методики

- 1 Для *in vitro* диагностики.
- 2 В данной методике в **Отчете об анализе данных полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS** фиксируется только наличие или отсутствие мутаций в генах *NRAS* и *KRAS*, перечень которых приведен в таблице 1.
- 3 В исследовании по оценке 685 образцов из банка тканей, 31% не удовлетворяли требованию контроля качества (КК) dCq ≤ 5,0.
- 4 Необходимо, чтобы в FFPE ткани, предназначенной для секвенирования, содержание

опухолевой ткани составляло $\geq 50\%$.

Реагенты

Реагенты, поставляемые в наборе

Компания «Иллюмина» предоставляет следующие реагенты для набора реагентов Praxis Extended RAS (таблица 2–таблица 10). № по каталогу 20012431 рассчитан на 2 прогона с максимальным количеством 10 образцов с 2 контрольными образцами на один прогон.

Набор реагентов Praxis Extended RAS, коробка 1

Коробка 1А: Реагенты пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)	1 пробирка	4,32 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли и формамид	-25 °C – -15 °C
Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)	1 пробирка	4,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий патентованную смесь ДНК-полимераз, ДНК-лигазы и dNTP	-25 °C – -15 °C
Праймеры индексированные A-N (A501-A508) (Index Primers A (A501))	1 пробирка на один праймер	192 мкл	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования	-25 °C – -15 °C
Праймеры индексированные 1-12 (A701-A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712))	1 пробирка на один праймер	128 мкл	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования	-25 °C – -15 °C
ПЦР полимеразы (PCR Polymerase)	1 пробирка	56 мкл	Патентованная ДНК-полимераза	-25 °C – -15 °C
Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)	1 пробирка	2,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли и dNTP	-25 °C – -15 °C

Коробка 1В: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)	1 пробирка	4,6 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид	-25 °C – -15 °C
Буфер для разведения библиотек (Library)	2 пробирки	4,5 мл	Водный буферный раствор	-25 °C – -15 °C

Dilution Buffer)

Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)	1 пробирка	10 мкл	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК PhiX	-25 °C – -15 °C
--	------------	--------	--	-----------------

Набор реагентов Praxis Extended RAS, коробка 2

Коробка 2: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Содержимое	Хранение
Картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3)	2 картриджа	Картридж однократного применения, содержащий реагенты для образования кластеров и секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx, в том числе формамид, 2- меркаптоэтанол и <2% ДМСО	-25 °C – -15 °C

Набор реагентов Praxis Extended RAS, коробка 3

Коробка 3А: Реагенты для пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняе мый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер для интенсивной 1 отмывки (Stringent Wash Buffer)	1 флакон	24 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2- меркаптоэтанол и формамид	2 °C – 8 °C
Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)	1 пробирка	4,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли	2 °C – 8 °C

Коробка 3В: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняе мый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Микрочастицы для очистки ПЦР- продуктов (PCR Clean- Up Beads)	1 пробирка	5 мл	Водный буферный раствор, содержащий твердофазные парамагнитные гранулы и полиэтиленгликоль	2 °C – 8 °C
Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)	2 пробирки	4,8 мл	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2- меркаптоэтанол и формамид	2 °C – 8 °C
Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)	1 пробирка	1,2 мл	Водный буферный раствор, содержащий твердофазные парамагнитные гранулы	2 °C – 8 °C
Ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell)	2 резервуара	1 проточная ячейка	Стеклянная подложка с ковалентно связанными олигонуклеотидами	2 °C – 8 °C

Набор реагентов Praxis Extended RAS, коробка 4

Коробка 4: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))	2 флакона	500 мл	Водный буферный раствор	2 °C – 8 °C

Набор реагентов Praxis Extended RAS, коробка 5

Коробка 5: Реагенты для пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)	2 планшета	Н/П	Полипропиленовый микропланшет с мембраной из модифицированного полиэфирсульфона	15 °C – 30 °C

Коробка 5: Реагенты для пост-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Буфер для элюции (Elution Buffer)	1 пробирка	4,8 мл	Водный буферный раствор	15 °C – 30 °C
Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)	1 пробирка	3,5 мл	Водный буферный раствор	15 °C – 30 °C

Набор реагентов Praxis Extended RAS, коробка 6

Коробка 6: Реагенты для пре-амплификации

Компонент	Количество	Заполняемый объем	Активные ингредиенты	Хранение
Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)	1 пробирка	150 мкл	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды, нацеленные на гены RAS	-25 °C – -15 °C
Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)	1 пробирка	150 мкл	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды, нацеленные на гены RAS	-25 °C – -15 °C
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	4 пробирки	75 мкл	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды для оценки качества образца ДНК	-25 °C – -15 °C
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)	1 пробирка	220 мкл	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК для оценки качества образца ДНК	-25 °C – -15 °C
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	2 пробирки	1 мл	Водный буферный раствор, содержащий компоненты реакции количественной ПЦР	-25 °C – -15 °C

Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)	I пробирка 8 мкл	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК для положительного контроля	-25 °C – -15 °C
--	------------------	---	-----------------

Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Реагенты используемые до амплификации

- ✦ 10 N NaOH (готовят из таблеток или используют стандартный раствор)
- ✦ Буфер TE
- ✦ Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз

Реагенты, используемые после амплификации

- ✦ 10 N NaOH (готовят из таблеток или используют стандартный раствор)
- ✦ Этанол, 200 (абсолютный) для молекулярной биологии
- ✦ Буфер TE
- ✦ Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз

Хранение и обращение

- 1 Комнатная температура - температура от 15 °C до 30 °C.
- 2 Реагенты поставляются в достаточном количестве для 2-х отдельных применений, которые включают максимально 12 образцов/24 библиотеки для каждого образца, вместе с контрольными образцами. Если для реагента не указано «только для однократного применения», в промежутке между применениями реагенты следует снова закрыть крышками и поместить обратно в указанные условия хранения.
- 3 Указанные ниже реагенты транспортируются в замороженном виде и стабильны в условиях хранения при температуре от -25 °C до -15 °C до указанной даты истечения срока годности.
 - ✦ Пул праймеров A
 - ✦ Пул праймеров B
 - ✦ Буфер для гибридизации
 - ✦ Смесь для удлинения-лигирования
 - ✦ Праймеры индексированные A-H (A501-A508)
 - ✦ Праймеры индексированные 1-12 (A701-A712)
 - ✦ ПЦР полимеразы
 - ✦ Смесь для ПЦР
 - ✦ Разбавитель для разведения библиотек при нормализации
 - ✦ Буфер для разведения библиотек
 - ✦ Контроль внутренний PhiX
 - ✦ Картридж MiSeq™ Dx SBS v3
 - ✦ Праймеры контрольные для проверки качества
 - ✦ ДНК контрольная для проверки качества
 - ✦ Библиотека контрольная RAS
 - ✦ Смесь для количественной ПЦР

За исключением картриджа с реагентами перечисленные выше реагенты стабильны в течение максимум 5 циклов замораживания и размораживания до указанной даты истечения срока годности. Праймеры индексированные и картридж MiSeq™ Dx SBS v3 предназначены только для однократного применения.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Не храните реагенты в холодильнике без заморозки или в дверных отсеках. После размораживания картриджа с реагентами не замораживайте его повторно. Его можно хранить при температуре от 2 °C до 8 °C до 6 часов.

- 4 Указанные ниже реагенты транспортируются в охлажденном виде и стабильны в условиях

хранения при температуре от 2 °C до 8 °C до указанной даты истечения срока годности.

- ✦ Буфер для интенсивной отмывки
- ✦ Буфер универсальный, промывочный
- ✦ Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов
- ✦ Микрочастицы для библиотеки
- ✦ Раствор промывочный для нормализации библиотек
- ✦ Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2)
- ✦ Ячейка проточная MiSeq™ Dx

Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) и ячейка проточная MiSeq™ Dx предназначены только для однократного применения.

- 5 Указанные ниже реагенты транспортируются при температуре окружающей среды и стабильны в условиях хранения при комнатной температуре до указанной даты истечения срока годности.

- ✦ Буфер для элюции
- ✦ Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx
- ✦ Буфер для хранения библиотек

Фильтровальный планшет предназначен только для однократного использования.

- 6 Изменения физических свойств реагентов, поставляемых в наборе, могут свидетельствовать об ухудшении их качества. При появлении изменений физических свойств, например, видимого изменения цвета или помутнения реагентов, которое свидетельствует о микробной контаминации, не используйте эти реагенты.

- 7 В таких реагентах, как буфер для гибридизации, буфер для интенсивной отмывки и разбавитель для разведения библиотек при нормализации, могут образоваться видимые осадки или кристаллы. Перед использованием тщательно перемешайте их на вортексе, а затем осмотрите визуально, чтобы убедиться в отсутствии осадков.

- 8 При работе с микрочастицами для очистки ПЦР-продуктов и с микрочастицами для библиотеки соблюдайте следующие практические рекомендации:

- ✦ Не замораживайте микрочастицы.
- ✦ Выдерживайте микрочастицы до достижения комнатной температуры.
- ✦ Непосредственно перед использованием тщательно перемешайте микрочастицы на вортексе до однородного цвета.
- ✦ После добавления микрочастиц тщательно перемешайте образец пипеткой (вверх и вниз 10 раз).
- ✦ Альтернативно тщательно перемешайте исследуемые образцы на шейкере.
- ✦ Инкубируйте смесь образца с микрочастицами при комнатной температуре в течение указанного периода времени.
- ✦ Следуйте инструкциям по использованию магнитного штатива. Перед удалением раствора дождитесь, чтобы он стал прозрачным. Удерживая планшет на магнитном штативе, медленно отбирайте супернатант, стараясь не затрагивать отделившиеся микрочастицы.

- 9 Плашку ПЦР можно оставить на термоциклере на ночь или хранить при температуре от 2 °C до 8 °C до 2 суток. Перед хранением плашки при 2 °C – 8 °C тщательно запечатайте ее.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Не замораживайте микрочастицы для библиотеки или их смесь с разбавителем для разведения библиотек при нормализации, если не собираетесь использовать их сразу.

- 10 Разведенную библиотеку ампликонов можно хранить при температуре от -25 °C до -15 °C в течение 30 суток.

Оборудование и материалы

Необходимое оборудование и материалы, поставляемые отдельно

- | | |
|---|--|
| 1 | Прибор генетический секвенатор MiSeqDx, № по каталогу DX-410-1001 |
| 2 | Набор TruSeq® Index Plate Fixture Kit, № по каталогу FC-130-1005 |
| 3 | Набор TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit, № по каталогу FC-130-1007 |

Необходимое оборудование и материалы, не поставляемые с набором

Оборудование и материалы, используемые до амплификации

- 1 **Реагенты для выделения и очистки ДНК** — см. *Выделение ДНК* на странице 12.
 - 2 **Термоблок** — необходим один термоблок для 96-луночной плашки для ПЦР. Термоблок должен иметь следующие технические характеристики. Необходимо использовать термоблоки с нагреваемыми крышками.
 - * Диапазон температуры: от +5 °C до 99 °C
 - * Регулирование температуры: $\pm 0,1$ °C при 37 °C; $\pm 0,4$ °C при 60 °C
 - 3 **Термостат для образцов** — необходим один термостат (термостат для гибридизации). Термостат должен иметь следующие технические характеристики.
 - * Диапазон температуры: 10 °C – 100 °C
 - * Регулирование температуры: $\pm 0,2$ °C
 - 4 **Настольная центрифуга** — необходима одна настольная центрифуга. Для работы в постамплификационной зоне требуется отдельная центрифуга. Приемлема любая центрифуга для плашек, позволяющая достичь скоростей, указанных в протоколе (от 280 до 2400 $\times$ g).
 - 5 **Микроцентрифуга** — одна микроцентрифуга для центрифужных микропробирок.
 - 6 **Прецизионные пипетки** — необходим один комплект высокоточных пипеток (для работы в постамплификационной зоне требуется отдельный комплект). Использование высокоточных пипеток необходимо для обеспечения точного внесения реагентов и исследуемых образцов. Можно использовать одноканальные или многоканальные пипетки при условии их регулярной калибровки и точности в пределах 5% указанного объема.
 - 7 **Роликовое или клиновидное устройство для запечатывания плашек** — необходимо для запечатывания плашек для ПЦР.
 - 8 **Расходные материалы** — необходимы следующие расходные материалы.
 - * 96-луночные или 384-луночные оптические ПЦР-плашки и пленки
 - * 96-луночные плашки для ПЦР с юбкой, 0,2 мл, из полипропилена или эквивалентного материала
 - * 96-луночные плашки для хранения, 0,8 мл (плашки MIDI)
- ПРИМЕЧАНИЕ**
Убедитесь, что 96-луночная плашка подходит к магнитному штативу.
- * Стрипы на восемь пробирок для ПЦР
 - * Ванночка (лоток) для растворов, ПВХ, свободная от РНКаз/ДНКаз
 - * Устройство для термического запечатывания плашек
- ПРИМЕЧАНИЕ**
При отсутствии устройства для термического запечатывания плашек можно использовать алюминиевую фольгу.
- * Алюминиевая фольга
 - * Подходящие пленки для ПЦР-плашек
 - * Наконечники для пипеток с аэрозольным фильтром

Оборудование и материалы, используемые после амплификации

- 1 **96-луночная или 384-луночная система детектирования для количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени** — необходима одна система детектирования для количественной ПЦР в режиме реального времени. Система должна обладать следующими техническими характеристиками. Кроме того, система должна иметь нагреваемую крышку и поддерживать 96-луночный или 384-луночный формат.
 - * Минимальный диапазон температуры: 37 °C – 95 °C
 - * Точность/однородность: $\pm 0,5$ °C
 - * Краситель: FAM
- 2 **Термоциклер** — необходим один термоциклер. Термоциклер должен иметь нагреваемую крышку и обладать следующими техническими характеристиками:
 - * Минимальный диапазон контроля температуры: 4 °C – 99 °C
 - * Точность контроля: $\pm 0,3$ °C
- 3 **Оптическая компрессионная прокладка** — оптическая прокладка для надавливания

рекомендуется для обеспечения надлежащей термоизоляции между термоциклером и реакционными плашками при использовании пленок для плашек.

- 4 **Шейкер для плашек** — для работы в постамплификационной зоне лаборатории необходим один шейкер для плашек. Шейкер для плашек должен иметь следующие технические характеристики.
 - ✦ Максимальная скорость перемешивания: 3000 об/мин
 - ✦ Диапазон скорости перемешивания: от 200 до 3000 об/мин
- 5 **Настольная центрифуга** — необходима одна настольная центрифуга. Для работы в преамплификационной зоне требуется отдельная центрифуга. Приемлема любая центрифуга для плашек, позволяющая достичь скоростей, указанных в протоколе (от 280 до 2400 × g).
- 6 **Термоблок** — необходим один термоблок для пробирок. Термоблок должен обладать следующими техническими характеристиками.
 - ✦ Диапазон температуры: от +5 °C до 99 °C
 - ✦ Регулирование температуры: ±0,1 °C при 37 °C; ±0,4 °C при 60 °C
- 7 **Магнитный штатив** — необходим один магнитный штатив для 96-луночной плашки. Лучшая воспроизводимость отмечена при расположении магнитов на боку, а не на дне штатива.
- 8 **Прецизионные пипетки** — необходим один комплект высокоточных пипеток. (Для работы в преамплификационной зоне требуется отдельный комплект). Использование высокоточных пипеток необходимо для обеспечения точного внесения реагентов и исследуемых образцов. Можно использовать одноканальные или многоканальные пипетки при условии их регулярной калибровки и точности в пределах 5% указанного объема.
- 9 **Принадлежности для гель-электрофореза** — необходимые принадлежности и прибор для электрофореза должны соответствовать методике окрашивания для визуализации ПЦР-продуктов в геле.
- 10 **Расходные материалы** — необходимы следующие расходные материалы.
 - ✦ 96-луночные плашки для ПЦР с юбкой, 0,2 мл, из полипропилена или эквивалентного материала
 - ✦ 96-луночные плашки для хранения, 0,8 мл (планшеты MIDI)

ПРИМЕЧАНИЕ:

Убедитесь, что 96-луночная плашка подходит к магнитному штативу.

- ✦ 2-4%-ный агарозный гель на трис-боратном электрофорезном буфере (ТБЕ)
- ✦ Маркер молекулярной массы ДНК 100 п. о.
- ✦ Краситель для нанесения ДНК на гель
- ✦ Конические пробирки емкостью 15 мл
- ✦ Центрифужные микропробирки
- ✦ Стрипы на восемь пробирок для ПЦР
- ✦ Ванночки (лотки) для растворов, PBX, свободные от РНКаз/ДНКаз
- ✦ Пленки для запечатывания планшета
- ✦ Наконечники для микропипеток с аэрозольным фильтром

Отбор, перевозка и хранение образцов

Оценка ткани

Для работы с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel используют образцы ДНК, выделенной из фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) образцов ткани колоректального рака (CRC). Подготовка образцов тканей FFPE CRC для выделения ДНК:

- 1 С помощью чистого стерильного скальпеля отрежьте излишний парафин от ткани. Для выделения ДНК используйте серийные срезы.
- 2 Используйте срезы, содержащие ≥50% опухолевой ткани по площади без макродиссекции.
- 3 Для срезов, в которых площадь опухолевой ткани составляет менее 50%, обогащение опухолевой ткани проводят путем макроскопического препарирования срезов до получения ≥50% опухолевой ткани по площади. Чтобы максимально увеличить общую площадь ткани, фиксированной на предметном стекле, рекомендуется макроскопическое препарирование до получения 50%

опухолевой ткани по площади.

Увеличение общей площади ткани, фиксированной на предметном стекле, во время макроскопического препарирования



Содержание опухолевой ткани по площади составляет 20%.



Проводят макроскопическое препарирование до получения $\geq 50\%$ опухолевой ткани по площади, максимально увеличивая при этом общую площадь ткани, фиксированной на предметном стекле.

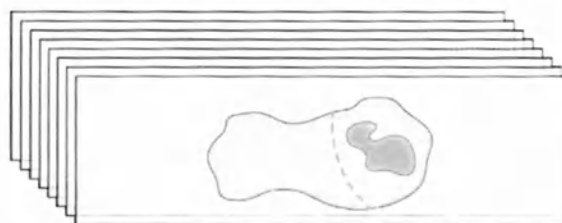
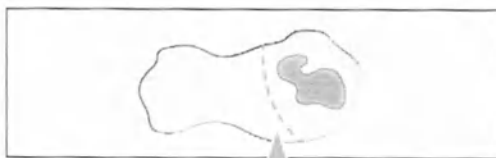
- 4 Совокупная площадь ткани равна общей площади ткани на количество срезов для общего количества срезов толщиной 5 мкм. Для получения оптимальных результатов рекомендуемая совокупная площадь ткани при использовании срезов толщиной 5 мкм составляет 240 мм^2 или более при содержании опухолевой ткани $\geq 50\%$ по площади. Для оптимального выхода ДНК используйте как минимум 8 срезов толщиной 5 мкм или эквивалентное количество серийных срезов другой толщины.



ПРИМЕЧАНИЕ:

При определении совокупной площади ткани следует использовать площадь ткани, полученной макроскопическим препарированием.

Рекомендуемая совокупная площадь ткани составляет $\geq 240 \text{ мм}^2$



Для одного предметного стекла в соответствии с требованиями:

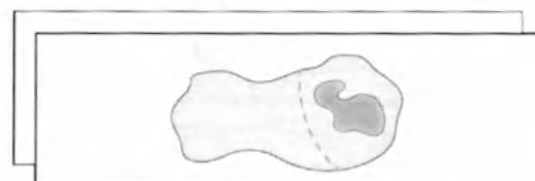
Проводят макроскопическое препарирование до получения $\geq 50\%$ опухолевой ткани по площади, максимально увеличивая при этом общую площадь ткани, фиксированной на предметном стекле.

Рекомендуемая совокупная площадь ткани:

Для срезов толщиной 5 мкм совокупная площадь ткани, содержащей $\geq 50\%$ опухолевой ткани по площади, составляет 240 мм^2 . Для оптимального выхода ДНК используйте как минимум восемь предметных стекол.

- 5 При использовании срезов толщиной 5 мкм минимальная совокупная площадь ткани, содержащей $\geq 50\%$ опухолевой ткани по площади, составляет 80 мм^2 . Для серийных срезов другой толщины можно также использовать эквивалентную совокупную площадь ткани.

Рисунок 1. Минимальная совокупная площадь ткани составляет 80 мм^2



Для одного предметного стекла в соответствии с

Минимальная совокупная площадь ткани:

требованиями:

Проводят макроскопическое препарирование до получения $\geq 50\%$ опухолевой ткани по площади, максимально увеличивая при этом общую площадь ткани, фиксированной на предметном стекле.

Для срезов толщиной 5 мкм совокупная площадь ткани, содержащей $\geq 50\%$ опухолевой ткани по площади, составляет 80 мм².

- 6 Для работы с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel можно использовать образцы выделенной ДНК с величиной дельта-Cq $\leq 5,00$.
- 7 [Необязательно] Если образцы выделенной ДНК не соответствуют пороговой величине дельта-Cq, для выделения можно использовать дополнительные срезы при их наличии.

Выделение ДНК

- Компания «Иллюмина» рекомендует использовать наборы реагентов для выделения ДНК, основанные на колоночном методе выделения, с использованием удвоенного количества протеиназы К, инкубацию с протеиназой К в течение ночи с помешиванием и элюирование как минимум в объеме 30 мкл.
- Для данного набора не рекомендуется использовать методики выделения с применением магнитных микрочастиц, или в которых используется только лизис неочищенных клеточных экстрактов.
- Компания «Иллюмина» рекомендует хранить выделенную геномную ДНК при температуре от 2 °C до 8 °C в течение максимум 28 суток или хранить ее в замороженном виде при температуре от -15 °C до -25 °C в течение максимум 161 суток. Геномная ДНК, хранившаяся в замороженном виде, стабильна в течение максимум 2 циклов замораживания и размораживания.

Особые указания и меры предосторожности**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**

Федеральный закон разрешает продажу этого устройства только по заказу врачей или других практикующих специалистов, имеющих лицензию в соответствии с законодательством штата, в котором он/она работает, для применения данного устройства или заказа на его применение.

- 1 **Некоторые компоненты набора реагентов содержат потенциально опасные химические вещества. Вред для персонала может быть причинен в результате вдыхания, проглатывания, попадания на кожу и попадания в глаза. Во избежание риска воздействия используйте средства защиты, в том числе средства защиты глаз, перчатки и лабораторный халат. С использованными реагентами обращаются как с химическими отходами и утилизируют их в соответствии с применимыми региональными, национальными и местными законами и нормативами. Дополнительные сведения о сохранении окружающей среды и безопасности см. паспорта безопасности на сайте support.illumina.com/sds.html. (Дополнительную информацию см. в разделе «Реагенты» на странице 6.)**
- 2 Со всеми образцами обращаются как с потенциально инфекционными агентами.
- 3 Несоблюдение описанных выше процедур может привести к ошибочным результатам или значительному снижению качества исследуемого образца.
- 4 Используйте стандартные меры предосторожности при работе в лаборатории. Не отбирайте реагенты ртом. Не принимайте пищу, напитки и не курите в зонах, предназначенных для работы. При работе с исследуемыми образцами и реагентами набора используйте одноразовые перчатки и лабораторные халаты. После работы с исследуемыми образцами и реагентами набора тщательно вымойте руки.
- 5 Не используйте компоненты набора после даты истечения срока годности, указанной на этикетке картонной упаковки набора реагентов. Не заменяйте компоненты набора компонентами из других товарных партий. Идентификаторы товарных партий набора указаны на этикетке картонной упаковки набора.
- 6 Храните компоненты набора при указанной температуре в предусмотренных преамплификационной и постамплификационной зонах.
- 7 Многократные циклы замораживания и размораживания компонентов коробки 1 и коробки 6 до

5 раз не окажут отрицательного влияния на единообразие результатов анализа.

- 8 Индексированные праймеры предназначены только для однократного использования, и после использования их следует уничтожить.
- 9 Чтобы предотвратить повреждение исследуемого образца или реагента, перед началом выполнения протокола убедитесь, что все пары гипохлорита натрия полностью улетучились.
- 10 Для предотвращения контаминации продуктами ПЦР реагентов, приборов и образцов геномной ДНК необходимо соблюдать правила надлежащей лабораторной практики и надлежащей гигиены при работе в лаборатории. Контаминация может привести к неправильным и недостоверным результатам.
- 11 Для предотвращения контаминации убедитесь, что преамплификационная и постамплификационная зоны снабжены необходимым оборудованием, например пипетками, наконечниками для пипеток, вортексом и центрифугой.
- 12 Избегайте перекрестной контаминации. Каждый раз перед отбором нового исследуемого образца и добавлением нового реагента используйте новый наконечник для пипетки. Перемешивайте исследуемые образцы с помощью пипетки и центрифугируйте планшет в соответствии с указаниями. Не используйте вортекс для плашек. Использование наконечников с аэрозольным фильтром уменьшает риск переноса ампликонов и перекрестной контаминации между исследуемыми образцами.
- 13 Пары индекс-образец должны точно соответствовать печатным символам схемы нанесения в лунки планшета. Несовпадения между исследуемым образцом и печатным символом схемы нанесения в лунки планшета приведут к неверной идентификации положительных образцов и некорректным результатам, представляемым в отчете.
- 14 Для стадий промывки всегда готовьте свежий 80%-ный раствор этанола. Этанол может поглощать воду из воздуха, что влияет на результаты.
- 15 При выполнении стадий промывания убедитесь, что весь этанол удален со дна лунок. Остаточный этанол может повлиять на результаты.
- 16 При выполнении стадии в магнитном штативе соблюдайте указанное время высушивания, чтобы гарантировать полное испарение. Остаточный этанол может повлиять на воспроизводимость последующих реакций.
- 17 Не смешивайте пул праймеров А, пул праймеров В и буфер для гибридизации для хранения. При объединении пулы праймеров утрачивают стабильность даже при хранении в замороженном виде.
- 18 Для стадии гибридизации не рекомендуется использовать термоциклеры с активным охлаждением, например, с элементами Пельтье и с термоэлектрическим охлаждением. Стадия пассивного охлаждения является критической для правильной гибридизации.
- 19 ПЦР-полимеразу всегда добавляйте в смесь для ПЦР непосредственно перед использованием. Ни в коем случае не храните объединенный рабочий раствор.
- 20 На стадии нормализации библиотеки крайне важно ресуспендировать осадок микрочастиц для библиотеки. Это существенно для достижения единообразной плотности кластеров в проточной ячейке на генетическом секвенаторе MiSeqDx.
- 21 На стадии нормализации библиотеки соблюдайте указанное время инкубации. Неправильная инкубация может повлиять на представленность библиотеки и плотность кластеров.
- 22 В связи с многократными переносами плашек и возможностью последующей контаминации следует уделять особое внимание. Необходимо убедиться, что все содержимое лунки полностью осталось в лунке. Не выплескивайте содержимое лунок.
- 23 Образцы ДНК, позволяющие получить величину дельта-Cq, меньшую или равную 5,00, можно использовать для работы. Illumina не поддерживает использование образцов геномной ДНК (гДНК) с величиной дельта-Cq более 5,00 для работы с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Последовательности индексированных праймеров

Последовательности индексированных праймеров А-Н (A501-A508)

Индексированный праймер	Последовательность
Индексированный праймер А (A501)	TGAACCTT

Индексированный праймер В (A502)	TGCTAAGT
Индексированный праймер С (A503)	TGTTCTCT
Индексированный праймер D (A504)	TAAGACAC
Индексированный праймер E (A505)	CTAATCGA
Индексированный праймер F (A506)	CTAGAACA
Индексированный праймер G (A507)	TAAGTTCC
Индексированный праймер H (A508)	TAGACCTA

Последовательности индексированных праймеров 1-12 (A701-A712)

Индексированный праймер	Последовательность
Индексированный праймер 1 (A701)	ATCACGAC
Индексированный праймер 2 (A702)	ACAGTGGT
Индексированный праймер 3 (A703)	CAGATCCA
Индексированный праймер 4 (A704)	ACAAACGG
Индексированный праймер 5 (A705)	ACCCAGCA
Индексированный праймер 6 (A706)	AACCCCTC
Индексированный праймер 7 (A707)	CCCAACCT
Индексированный праймер 8 (A708)	CACCACAC
Индексированный праймер 9 (A709)	GAACCCA
Индексированный праймер 10 (A710)	TGTGACCA
Индексированный праймер 11 (A711)	AGGGTCAA
Индексированный праймер 12 (A712)	AGGAGTGG

Инструкция по применению

Оценка качества ДНК, выделенной из образцов FFPE

Подготовка

- 1 Доведите ДНК контрольную для проверки качества, праймеры контрольные для проверки качества, смесь для количественной ПЦР и геномную ДНК до комнатной температуры.
- 2 Поместите размороженные пробирки на лед.



ПРИМЕЧАНИЕ

Во избежание замораживания и размораживания при первом использовании контрольной ДНК для проверки качества отберите аликвоты по 7 мкл в разные пробирки стрипа для ПЦР для длительного хранения.

Методика

- 1 Определите схему нанесения в лунки планшета для реакции количественной ПЦР.



ПРИМЕЧАНИЕ

Необходимо тестировать все исследуемые образцы, контрольную ДНК для проверки качества и контрольный образец без матрицы (NTC, No Template Control) в трех повторностях.

Дополнительную информацию о схемах нанесения в лунки планшетов см. в документе *Справочное руководство Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (документ № 1000000037191)*.

- 2 Добавьте 5 мкл контрольной ДНК для проверки качества к 495 мкл свободной от РНКаз/ДНКаз воды в центрифужной микропробирке.
- 3 Перемешайте разведенный образец на вортексе.
- 4 Добавьте 1,5 мкл выделенной геномной ДНК к 148,5 мкл свободной от РНКаз/ДНКаз воды в стрипе на восемь пробирок до получения 100-кратного разведения.
- 5 Перемешайте разведения пипеткой P200 (вверх и вниз 10 раз).
- 6 Добавьте 150 мкл разведенной контрольной ДНК для проверки качества в неиспользованную пробирку стрипа на восемь пробирок в соответствии со схемой нанесения в лунки планшета.
- 7 В другую неиспользованную пробирку добавьте 150 мкл безнуклеазной воды для использования в качестве образца NTC.
- 8 Приготовьте смесь для количественной ПЦР в соответствии с 384-луночным или 96-луночным форматом. Смесь содержит дополнительный объем.
 - ▶ 384-луночный формат
 - ▶ Смесь для количественной ПЦР: 5,0 мкл на лунку (205 мкл на 36 реакций)
 - ▶ Праймеры контрольные для проверки качества: 0,8 мкл на лунку (33 мкл на 36 реакций)
 - ▶ Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз: 2,2 мкл на лунку (90 мкл на 36 реакций)
 - ▶ 96-луночный формат
 - ▶ Смесь для количественной ПЦР: 10,0 мкл на лунку (410 мкл на 36 реакций)
 - ▶ Праймеры контрольные для проверки качества: 1,6 мкл на лунку (66 мкл на 36 реакций)
 - ▶ Вода, свободная от РНКаз/ДНКаз: 4,4 мкл на лунку (180 мкл на 36 реакций)



ПРИМЕЧАНИЕ

Дополнительную информацию о приготовлении смеси для количественной ПЦР см. в документе *Справочное руководство Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (документ № 1000000037191)*.

- 9 Тщательно, но осторожно перемешайте реакционную смесь.
- 10 До использования поместите реакционную смесь в защищенное от света место.
- 11 Перенесите аликвоту смеси в лоток или стрип на восемь пробирок, чтобы использовать многоканальную пипетку.
- 12 Внесите 8 мкл (384-луночный формат) или 16 мкл (96-луночный формат) смеси в каждую лунку планшета для количественной ПЦР. Внимательно следите за точным переносом в лунки, поскольку незначительные изменения могут повлиять на результаты.
- 13 Внесите в каждую лунку планшета 2 мкл (384-луночный формат) или 4 мкл (96-луночный формат) разведенной ДНК контрольной для проверки качества (QC Template), разведенных исследуемых образцов или воды свободной от нуклеаз. Внимательно следите за точным переносом в лунки, поскольку незначительные изменения могут повлиять на результаты.
- 14 Запечатайте планшет пленкой, подходящей для используемого прибора, старайтесь избежать перекрестной контаминации и попадания на поверхность крышек. Убедитесь, что пленка расположена правильно, а планшет запечатан равномерно.
- 15 При необходимости поместите планшет в адаптер и центрифугируйте планшет при $1000 \times g$ в течение 1 минуты.
- 16 Убедитесь, что пленка не имеет какой-либо жидкости или пыли, поместите планшет в прибор для количественной ПЦР в правильной ориентации, затем закройте крышку и проводите количественную ПЦР в соответствии со следующим температурным профилем:
 - ▶ «Горячий» старт
 - ▶ 50 °C в течение 2 минут
 - ▶ 95 °C в течение 10 минут
 - ▶ x40
 - ▶ 95 °C в течение 30 секунд
 - ▶ 57 °C в течение 30 секунд
 - ▶ 72 °C в течение 30 секунд
 - ▶ Подтвердите, что прибор фиксирует изображения после стадии 72 °C.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Во избежание неточных измерений из-за фона, пороговое значение Cq следует настроить так, чтобы оно подходило для данного прибора.

- 17 После конечной стадии термоциклер выполняет анализ образцов. Убедитесь, что графики амплификации ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) соответствуют ожидаемым. Для большинства систем Cq амплификации ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) соответствует приблизительно 15–22 циклам. Исключите из группы трех повторностей те повторности, которые отличаются от основной группы на $>0,5$ Cq. Как минимум две из трех повторностей $\leq 0,5$ Cq должны быть включены в финальные вычисления. Если эти критерии качества не выполнены, для таких образцов следует повторить процесс оценки качества.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Если повторности исключены из четырех или более образцов на один прогон 10 образцов, это указывает на технические ошибки, поэтому процесс оценки качества следует повторить для всех образцов.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Если небольшая или неизмеримая амплификация происходит у двух или более повторностей, для таких образцов следует повторить процесс оценки качества.

- 18 Повторности, для которых кривые амплификации отличаются от ожидаемых, следует исключить.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Дополнительную информацию о надлежащих кривых амплификации см. в документе *Руководство справочное Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel* (документ № 1000000037191).

- 19 Среднее значение Cq ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) вычитают из среднего значения Cq для каждого образца (среднее значение Cq образца – среднее значение Cq ДНК контрольной для проверки качества (QC Template) с получением значений дельта-Cq для каждого образца. Регистрируют значения дельта-Cq и коэффициенты разведения образца. Коэффициенты разведения образца определяют на основании рекомендаций в разделе *Руководство справочное Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel* (документ № 1000000037191).

- 20 Убедитесь, что амплификация NTC происходит как минимум через 10 циклов после амплификации ДНК контрольной для проверки качества (QC Template).

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Если NTC не проходит, повторите весь процесс оценки качества для всех образцов.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Компания «Иллюмина» рекомендует хранить выделенную геномную ДНК при температуре от 2 °C до 8 °C в течение максимум 28 суток или хранить ее в замороженном виде при температуре от -15 °C до -25 °C в течение максимум 161 суток. Геномная ДНК, хранившаяся в замороженном виде, стабильна в течение максимум 2 циклов замораживания и оттаивания.

Настройка параметров

Дополнительную информацию по программному обеспечению Local Run Manager см. в разделах *Руководство справочное к генетическому секвенатору MiSeqDx. Программный модуль Local Run Manager* (документ №1000000011880) и *Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis Extended RAS Panel* (документ №1000000011875).

- 1 Войдите в программу Local Run Manager.
- 2 Нажмите «Создать прогон» (Create Run) и выберите «Расширенная панель RAS» (Extended RAS).
- 3 Убедитесь, что в верхнем левом углу экрана появилась надпись «Создать прогон расширенной панели RAS Praxis» (Create Run Praxis Extended RAS).
- 4 Введите название, позволяющее идентифицировать прогон анализа высокопроизводительного секвенирования. Используйте буквы алфавита, пробелы, подчеркнутые пробелы или тире.
- 5 [Необязательно] Введите описание прогона, помогающее идентифицировать прогон. Используйте буквы алфавита.

Укажите образцы для прогона

Укажите образцы для прогона, используя следующие опции:

1 **Ввод образцов вручную** — используйте таблицу на экране «Создать прогон» (Create Run).

2 **Импортирование образцов** — перейдите во внешний файл в формате значений, разделенных запятой (*.csv).

Ввод образцов вручную

- 1 Для ввода информации об исследуемом образце выделите область A1 или E7 в таблице образцов.
Область A1 соответствует верхнему левому квадранту схемы планшета для гибридизации (Hyb) и включает образцы для пулов праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и B (Oligo Pool B – Extended RAS).
Область E7 соответствует нижнему правому квадранту схемы планшета для гибридизации (Hyb) и включает образцы для пулов праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и B (Oligo Pool B – Extended RAS).
- 2 Для каждой используемой лунки вводите уникальное название образца в поле «Название образца» (Sample Name) в таблице пула A. Используйте буквы алфавита, тире или подчеркнутые пробелы.
Название образца автоматически включается в соответствующую лунку в таблице пула B.
При вводе названия образца на экране появляются двойные адаптеры для каждого индексного прочтения (Index Read) определенной лунки.
- 3 [Необязательно] Несмотря на то, что рекомендуется схема по умолчанию, используйте выпадающее меню «Положительный контроль» (Positive Control) или «Отрицательный контроль» (Negative Control), чтобы изменить положение контрольных образцов.
- 4 Для отображения схемы планшета нажмите на пиктограмму  печати.
- 5 Выберите «Печать» (Print), чтобы распечатать схему планшета для справки при приготовлении библиотеки.
- 6 Нажмите на команду «Закрыть» (Close).
- 7 Нажмите на команду «Сохранить прогон» (Save Run).

Импортирование образцов

- 1 Нажмите на область A1 или E7.
- 2 Для вывода примера шаблона нажмите пиктограмму «Экспорт» (Export) .
- 3 Введите уникальное название образца в матрице, содержащей до 10 образцов, и сохраните файл. Используйте буквы алфавита, тире или подчеркнутые пробелы.

[Данные] [Data]	Названия образцов в виде шаблона 4 * 3 (Sample Names as a 4*3 matrix)	
Образец 1	Образец 5	Образец 9
Образец 2	Образец 6	Образец 10
Образец 3	Образец 7	Положительный_контроль
Образец 4	Образец 8	Отрицательный_контроль

- 4 Нажмите команду «Импортировать образцы» (Import Samples).
- 5 Перейдите в расположение файла информации об образце в формате файла *.csv.
- 6 После окончания работы для отображения схемы планшета нажмите на пиктограмме  печати.
- 7 Выберите «Печать» (Print), чтобы распечатать схему планшета для справки при приготовлении библиотеки.
- 8 Нажмите на команду «Закрыть» (Close).
- 9 Нажмите на команду «Сохранить прогон» (Save Run).

Гибридизация пула олигонуклеотидов

Подготовка

- 1 Определите образцы геномной ДНК, которые будут использоваться. Образцы, позволяющие получить величину дельта-Cq, меньшую или равную 5,00, можно использовать для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.
- 2 [Необязательно] Если образцы выделенной ДНК не соответствуют пороговой величине дельта-Cq, для выделения ДНК можно использовать дополнительные срезы ткани при их наличии.
- 3 Доведите до комнатной температуры пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS), пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS), буфер для гибридизации (Hybridization Buffer), образцы геномной ДНК и образец библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS).
- 4 Тщательно перемешайте пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS), пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS), буфер для гибридизации (Hybridization Buffer), на вортексе, чтобы убедиться, что все осадки растворились.
- 5 Установите температуру 96-луночного термоблока на 95 °C.
- 6 Предварительно нагрейте термостат до 37 °C
- 7 Создайте прогон и введите информацию об образцах на планшете в модуль анализа данных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Проверьте расположение положительного и отрицательного контроля, а затем распечатайте схему расположения образцов на планшете.

Методика

- 1 Извлеките из упаковки новый 96-луночный планшет для ПЦР (далее обозначенный как планшет **НУВ**).
 **ПРИМЕЧАНИЕ:**
 Дополнительную информацию о предлагаемой схеме планшета **НУВ** см. в документе *Руководство справочное Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (документ № 1000000037191)*.
- 2 Добавьте 10 мкл буфера TE в каждую из лунок отрицательного контроля (контроль без матрицы) для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS).
- 3 Для каждых 12 образцов/24 библиотеки внесите 2,5 мкл библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS) к 22,5 мкл буфера TE в центрифужную микропробирку. Тщательно перемешайте разведенный образец библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS).
- 4 Добавьте 10 мкл разведенного образца библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS), приготовленного на предыдущей стадии, в каждую из лунок положительного контроля для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS).
- 5 При необходимости разведите исследуемые образцы геномной ДНК в соответствии с рекомендациями в таблице 13.

Таблица 13. Таблица разведений дельта-Cq

Дельта Cq	<-1,51	от -1,50 до -0,51	от -0,50 до 0,50	от 0,51 до 1,50	от 1,51 до 5,00	>5,00
Разведение	4-кратное	2-кратное	Без разведения	Без разведения	Без разведения	Не поддерживается

- 6 Добавьте 10 мкл каждого при необходимости разведенного исследуемого образца геномной ДНК в соответствующие лунки для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS).



ПРИМЕЧАНИЕ

Дополнительную информацию о разведении исследуемых образцов и предлагаемой схеме планшета для

корректного выбора лунок пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) см. в документе *Руководство справочное Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel* (документ № 1000000037191)..

- 7 Добавьте по 5 мкл пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) во все лунки с геномной ДНК, образцом библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS), и отрицательным контрольным образцом для пула праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS). Добавьте по 5 мкл пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) во все лунки с геномной ДНК, образцом библиотеки контрольной RAS (Panel Control – Extended RAS) и отрицательным контрольным образцом для пула праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS).
 - 8 Добавьте к каждому образцу в планшете **НУВ** по 40 мкл буфера для гибридизации (Hybridization Buffer). Перемешайте смесь пипеткой (вверх и вниз 3–5 раз).
-  **ПРИМЕЧАНИЕ:**
Убедитесь, что все кристаллы или осадок в буфере для гибридизации (Hybridization Buffer) растворились.
- 9 Запечататайте планшет **НУВ** и центрифугируйте при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 1 минуты.
 - 10 Поместите планшет **НУВ** в предварительно нагретый блок при 95°C и инкубируйте в течение 1 минуты.
 - 11 Измените температуру в том же термоблоке на 40°C и инкубируйте в течение 3–18 часов.
-  **ПРИМЕЧАНИЕ:**
Перемещение планшета из термоблока на 95°C в другой предварительно нагретый термоблок, установленный на 40°C , окажет отрицательное влияние на результаты гибридизации.

Удаление несвязавшихся олигонуклеотидов

Подготовка

- 1 Доведите смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix), буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer) и буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer) до комнатной температуры, а затем кратковременно перемешайте на вортексе.
- 2 Соберите устройство для фильтрования на планшете (далее обозначенное как **FPU**) в следующем порядке снизу вверх: планшет MIDI, адаптерный воротничок, планшет фильтровальный и крышка.
- 3 Выполните предварительную промывку мембраны планшета фильтровального, как описано ниже:
 - а Добавьте в каждую лунку по 50 мкл буфера для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer).
 - б Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.
 - в Если промывочный буфер слит не полностью, еще раз центрифугируйте планшет фильтровальный при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.

Методика

- 1 Извлеките планшет **НУВ** из термоблока и центрифугируйте при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 1 минуты.
 - 2 Перенесите весь объем каждого образца (приблизительно 65 мкл) в соответствующие лунки планшета фильтровального.
 - 3 Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.
-  **ПРИМЕЧАНИЕ:**
Убедитесь, что жидкость после центрифугирования полностью слита. При необходимости повторите центрифугирование.

- 4 Выполните промывку фильтровального планшета, как описано ниже:
 - a Добавьте в каждую лунку с исследуемым образцом 50 мкл буфера для интенсивной отмычки (Stringent Wash Buffer).
 - b Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.
 - c Если промывочный буфер слит не полностью, еще раз центрифугируйте планшет фильтровальный при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 5 Повторите промывку, как описано на предыдущей стадии.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Если промывочный буфер слит не полностью, повторите центрифугирование при $2400 \times g$ при комнатной температуре до тех пор, пока вся жидкость не пройдет через фильтр (дополнительно в течение 5–10 минут).

- 6 Отбросьте весь фильтрат, содержащий формамид, затем повторно соберите FPU.
- 7 Добавьте в каждую лунку с исследуемым образцом по 45 мкл буфера универсального, промывочного (Universal Wash Buffer).
- 8 Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при $2400 \times g$ при комнатной температуре в течение 5 минут.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Убедитесь, что жидкость после центрифугирования полностью слита. При необходимости повторите центрифугирование.

Элонгация-лигирование связанных олигонуклеотидов

Методика

- 1 Добавьте в каждую лунку планшета фильтровального, содержащую исследуемый образец, по 45 мкл смеси для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)
- 2 Запечатайте планшет фильтровальный клеящейся алюминиевой фольгой, а затем закройте крышкой.
- 3 Инкубируйте FPU в подогретом до 37°C термостате в течение 45 минут.
- 4 Во время инкубации планшета FPU подготовьте планшет для амплификации AMP, как описано в следующем разделе.

ПЦР амплификация

Подготовка

- 1 Приготовьте свежий 0,05 N раствор NaOH, путем добавления 25 мкл 10 N NaOH к 4975 мкл стерильной воды.
- 2 Определите праймеры индексированные для использования в соответствии с графической схемой планшета, построенной модулем анализированных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.
- 3 Доведите смесь для ПЦР (PCR Master Mix) и соответствующие праймеры индексированные до комнатной температуры. Перемешайте содержимое каждой размороженной пробирки на вортексе, а затем кратковременно центрифугируйте пробирки.
- 4 Расположите праймеры в штативе по следующей схеме:
 - a Расположите пробирки с праймерами индексированными А (A501) – Н (A508) (Index Primers А (A501) – Н (A508)) (белые крышки, прозрачный раствор) в вертикальном направлении, выравнивая с рядами А–Н.
 - b Расположите пробирки с праймерами индексированными 1 (A701) – 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712)) (оранжевые крышки, желтый раствор) в горизонтальном направлении, выравнивая с колонками 1–12.
- 5 Извлеките из упаковки новый 96-луночный планшет для ПЦР (далее обозначенный как планшет

AMP).

- 6 Внесите праймеры индексируемые в лунки планшета AMP следующим образом:
 - a Добавьте по 9 мкл выбранных праймеров индексируемых A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508)) в соответствующие лунки колонки планшета **AMP**.
 - b Добавьте по 9 мкл выбранных праймеров индексируемых 1 (A701) – 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712)) в соответствующий ряд планшета **AMP**.

Во избежание перекрестной контаминации праймеров индексируемых необходимо менять наконечники после каждого ряда.
- 7 Приготовьте рабочий раствор для ПЦР смесь для ПЦР (PCR Master Mix) / ПЦР полимераз (PCR Polymerase), как описано ниже:
 - a Для 12 образцов/24 библиотек добавьте 21 мкл ПЦР полимеразы (PCR Polymerase) к 1050 мкл смеси для ПЦР (PCR Master Mix).
 - b Переверните приготовленный рабочий раствор для ПЦР 20 раз, чтобы перемешать. Рабочий раствор для ПЦР стабилен при комнатной температуре в течение 10 минут, а также при необходимости может храниться на льду во время приготовления.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Праймеры индексируемые предназначены только для однократного использования и должны быть сразу уничтожены после использования.

Методика

- 1 Извлеките **FPU** из термостата, а затем снимите герметичный слой алюминиевой фольги.
 - 2 Закройте планшет фильтровальный крышкой и центрифугируйте при 2400 × g при комнатной температуре в течение 2 минут.
 - 3 Добавьте в каждую лунку планшета фильтровального, содержащую исследуемый образец, по 25 мкл 0,05 N NaOH. Перемешайте NaOH пипеткой (вверх и вниз 5–6 раз), чтобы убедиться, что NaOH попадает на фильтр.
 - 4 Закройте и инкубируйте планшет фильтровальный при комнатной температуре в течение 5 минут.
 - 5 Во время инкубации планшета перенесите 22 мкл рабочего раствора для ПЦР в каждую лунку планшета AMP, содержащего праймеры индексируемые.
 - 6 Перенесите образцы, элюированные с фильтра, в планшет AMP, как описано ниже:
 - a Перемешайте образцы в первой колонке фильтровального планшета пипеткой (вверх и вниз 5–6 раз).
- 

ПРИМЕЧАНИЕ
Слегка наклоните планшет **FPU**, чтобы гарантировать полное отбирание и избежать образования пузырьков воздуха.
- b Перенесите по 20 мкл из планшета фильтровального в соответствующую колонку планшета **AMP**.
 - c Осторожно перемешайте пипеткой (5–6 раз вверх и вниз), чтобы тщательно объединить ДНК с рабочим раствором для ПЦР.
 - d Аналогичным образом перенесите образцы из остальных колонок планшета фильтровального в планшет AMP. **Во избежание перекрестной контаминации праймеров индексируемых и исследуемых образцов необходимо менять наконечники после каждой колонки.**
 - 7 Запечатлейте планшет **AMP** и закрепите с помощью резинового ролика.
 - 8 Центрифугируйте при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты.
 - 9 Перенесите планшет AMP в постаmplификационную зону.
 - 10 Проведите ПЦР, используя следующую программу на термодиклере:
 - ▶ 95 °C в течение 3 минут
 - ▶ 32 цикла:
 - ▶ 95 °C в течение 30 секунд
 - ▶ 66 °C в течение 30 секунд
 - ▶ 72 °C в течение 60 секунд

- 72 °C в течение 5 минут
- Выдерживание при 10 °C

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Если не переходить сразу к стадии очистки ПЦР, планшет **AMP** можно оставить на термоциклере на ночь или хранить при температуре от 2 °C до 8 °C вплоть до 48 суток.

Проверка приготовления библиотеки

- Объедините 5 мкл продукта амплификации с 15 мкл воды, свободной от РНКаз/ДНКаз, и при необходимости с красителем для нанесения ДНК на гель.
- Проведите электрофорез в 2-4% агарозном геле с маркером молекулярной массы 100 п. о., чтобы подтвердить наличие и яркость свечения продукта библиотеки 250-280 п. о.
 - Образцы, амплификация которых прошла с обоими пулами праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и B (Oligo Pool B – Extended RAS), считают действительными, и можно переходить к остальным стадиям последовательности действий.
 - Образцы, для которых амплификация с обоими пулами праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и B (Oligo Pool B – Extended RAS) была незначительной или отсутствовала, считают недействительными, и остальные стадии последовательности действий проводить нельзя. В случае недействительного результата гель-электрофореза необходимо повторить стадию приготовления библиотеки для этого образца или образцов.
 - Результат гель-электрофореза отрицательного контрольного образца – дорожка без ПЦР-продукта. Наличие продукта амплификации отрицательного контрольного образца с обоими пулами праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) и B (Oligo Pool B – Extended RAS), свидетельствует о возможных ошибках при обработке, т. е. контаминации, ошибках при переносе пипеткой или при составлении смесей исследуемых образцов. Оператор должен определить причину и при необходимости повторить приготовление библиотеки. В случае подозрения на контаминацию приготовление библиотеки следует повторить для всех образцов. При подозрении на ошибку при переносе пипеткой или составлении смесей повторите приготовление библиотеки.



ПРИМЕЧАНИЕ:

Дополнительную информацию и примеры достоверных и недостоверных результатов см. в документе *Руководство справочное Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (документ № 1000000037191)*.

Очистка ПЦР продуктов

Подготовка

- Доведите микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) до комнатной температуры.
- Приготовьте свежий 80%-ный раствор этанола из абсолютного этанола. Для 12 образцов/24 библиотек приготовьте 80%-ный раствор этанола, используя 12 мл абсолютного этанола и 3 мл воды, свободной от ДНКаз/РНКаз. Тщательно перемешайте.

Методика

- Центрифугируйте планшет **AMP** при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты.
- Извлеките из упаковки новый планшет MIDI (далее обозначенный как планшет **CLP**).
- Переверните микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) 10 раз. Тщательно перемешайте их на вортексе, а затем переверните еще 10 раз. Осмотрите раствор, чтобы убедиться, что все микрочастицы ресуспендированы.
- Добавьте в каждую лунку планшета **CLP** по 55 мкл микрочастиц для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads).
- Перенесите весь продукт ПЦР из планшета **AMP** в планшет **CLP**.
- Запечатйте планшет **CLP** и перемешивайте на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в

течение 2 минут.

- 7 Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре без перемешивания.
- 8 Поместите планшет на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
- 9 Пока планшет **CLP** находится на магнитном штативе, осторожно удалите супернатант.
- 10 Пока планшет **CLP** находится на магнитном штативе, промойте микрочастицы, как описано ниже:
 - a Добавьте в каждую лунку с исследуемым образцом 200 мкл свежеприготовленного 80%-ного раствора этанола.
 - b Инкубируйте планшет на магнитном штативе в течение минимум 30 секунд или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
 - c Осторожно удалите супернатант.
- 11 Повторите промывку, как описано на предыдущей стадии.
- 12 Для удаления избытка этанола используйте многоканальную пипетку P20, установленную на 20 мкл. Не взбалтывайте микрочастицы и не касайтесь их.
- 13 Снимите планшет **CLP** с магнитного штатива и подсушите микрочастицы на воздухе в течение 5 минут.
- 14 Добавьте к каждому исследуемому образцу по 25 мкл буфера для элюции (Elution Buffer).
- 15 Запечатлейте планшет **CLP** и перемешайте на вортексе для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут. После встряхивания проверьте, чтобы все образцы были ресуспендированы. Повторите эту стадию при необходимости.
- 16 Поместите планшет **CLP** на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
- 17 Извлеките из упаковки новый планшет MIDI (далее обозначенный как планшет **LNP**).
- 18 Перенесите по 20 мкл супернатанта из планшета **CLP** в планшет **LNP**.
- 19 [Необязательно] Перенесите остальные 5 мкл супернатанта из планшета **CLP** в новый планшет и промаркируйте названием и датой прогона. Храните этот планшет при температуре от -25 °C до -15 °C до завершения прогона секвенирования и анализа данных. Эти очищенные продукты ПЦР можно использовать для поиска и устранения неисправностей в случае неудачного прогона образцов.
- 20 Запечатлейте планшет **LNP** клеющейся пленкой для планшетов и центрифугируйте при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы весь супернатант оказался на дне лунки.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

После очистки продуктов ПЦР планшет стабилен в течение 3 часов при температуре от 2 °C до 8 °C.

Нормализация библиотеки

Подготовка

- 1 Приготовьте свежий 0,1 N раствор NaOH: смешайте 30 мкл 10 N NaOH и 2970 мкл воды, свободной от РНКаз/ДНКаз.
- 2 Доведите разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent), микрочастицы для библиотеки (Library Beads) и раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash) до комнатной температуры.
- 3 Тщательно перемешайте разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) на вортексе и убедитесь, что все осадки растворились.
- 4 Тщательно перемешайте микрочастицы для библиотеки (Library Beads) на вортексе в течение 1 минуты, периодически переворачивая пробирку, до тех пор, пока микрочастицы не ресуспендируются, а осадка на дне пробирки при ее переворачивании будет не видно.

Методика

- 1 Смешайте разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) и микрочастицы для библиотеки (Library Beads) в новой конической пробирке емкостью 15 мл, как описано ниже:
 - a Для 12 образцов/24 библиотек внесите 1575 мкл разбавителя для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) в коническую пробирку емкостью 15 мл.
 - b Для гомогенизации микрочастиц используйте пипетку P1000, установленную на 1000 мкл, чтобы тщательно ресуспендировать микрочастицы для библиотеки (Library Beads), тщательно перемешивая их пипеткой (вверх и вниз 10 раз).



ПРИМЕЧАНИЕ

Крайне важно полностью ресуспендировать осадок микрочастиц для библиотеки (Library Beads) на дне пробирки. Использование пипетки P1000 гарантирует однородное ресуспендирование микрочастиц и отсутствие их скопления на дне пробирки. Это существенно для достижения единообразной плотности кластеров в проточной ячейке.

- c Для 12 образцов/24 библиотек перенесите пипеткой 300 мкл микрочастиц для библиотеки (Library Beads), в пробирку, содержащую разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent).
 - d Перемешайте, переворачивая пробирку 15–20 раз.
- 2 Добавьте 45 мкл объединенного рабочего раствора разбавителя для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) и микрочастиц для библиотеки (Library Beads) в каждую лунку планшета LNP, содержащего библиотеки.
- 3 Запечатайте планшет LNP и перемешивайте на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 30 минут.
- 4 Поместите планшет LNP на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
- 5 Пока планшет LNP находится на магнитном штативе, осторожно удалите супернатант.
- 6 Снимите планшет LNP с магнитного штатива и промойте микрочастицы раствором промывочным для нормализации библиотек (Library Normalization Wash), как описано ниже:
 - a Добавьте в каждую лунку с исследуемым образцом по 45 мкл раствора промывочного для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)
 - b Запечатайте планшет LNP и перемешивайте на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут.
 - c Поместите планшет LNP на магнитный штатив минимум на 2 минуты или до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным.
 - d Осторожно удалите супернатант.
- 7 Повторите процедуру промывки для нормализации библиотеки, как описано на предыдущей стадии.
- 8 Запечатайте планшет LNP клеящейся пленкой для планшетов.
- 9 Центрифугируйте планшет LNP при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 30 секунд, чтобы собрать оставшийся промывочный раствор.
- 10 Поместите планшет LNP на магнитный штатив.
- 11 Для удаления избытка промывочного раствора для нормализации библиотеки используйте многоканальную пипетку P20, установленную на 20 мкл.
- 12 Снимите планшет LNP с магнитного штатива и добавьте в каждую лунку по 30 мкл 0,1 N NaOH.
- 13 Запечатайте планшет LNP и перемешивайте на шейкере для микропланшетов при 1800 об/мин в течение 5 минут.
- 14 Извлеките из упаковки новый 96-луночный планшет для ПЦР (далее обозначенный как планшет SGP).
- 15 Добавьте в каждую лунку, которая будет использоваться в планшете SGP, по 30 мкл буфера для хранения библиотек (Library Storage Buffer).
- 16 После 5-минутного встряхивания убедитесь, что все образцы в планшете LNP ресуспендированы. Если образцы не ресуспендированы, осторожно перемешайте эти образцы пипеткой вверх и вниз или слегка постучите планшетом по столу, чтобы ресуспендировать микрочастицы, затем встряхивайте еще 5 минут.

- 17 [Необязательно] Центрифугируйте планшет **LNP** при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 30 секунд, чтобы собрать образцы на дне лунки.
- 18 Поместите планшет **LNP** на магнитный штатив минимум на 2 минуты.
- 19 Перенесите супернатант из планшета **LNP** в планшет **SGP**. Осторожно перемешайте пипеткой (вверх и вниз 5 раз).
- 20 Запечататайте планшет **SGP**, а затем центрифугируйте при $1000 \times g$ при комнатной температуре в течение 1 минуты. Сразу переходите к объединению библиотек.

Объединение библиотек

Подготовка к объединению библиотек

- 1 Установите температуру термоблока, подходящего для центрифужных пробирок емкостью 1,5 мл, на 96°C .
- 2 Приготовьте ледяную баню. Охладите буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) на ледяной бане.
- 3 Начните размораживать картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3).

Подготовьте картридж с реагентами

- 1 Разморозьте картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3) на водяной бане, содержащей достаточное количество деионизированной воды комнатной температуры, чтобы погрузить основание картриджа с реагентами до уровня воды, отпечатанного на картридже с реагентами. Не допускайте превышения максимального уровня воды.
- 2 Оставьте картридж с реагентами для размораживания на водяной бане комнатной температуры приблизительно на 1 час или до оттаивания.
- 3 Извлеките картридж с реагентами из водяной бани и осторожно постучите им по столу, чтобы удалить воду из основания картриджа. Высушите основание картриджа. Убедитесь, что вода не попала на картридж с реагентами сверху.

Денатурация и разведение контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control)

- 1 Приготовьте 0,1 N NaOH путем объединения следующих объемов в конической пробирке:
 - ✦ Вода, свободная от ДНКаз и РНКаз (2475 мкл)
 - ✦ Исходный 10 N раствор NaOH (25 мкл)
 - 2 Переверните пробирку несколько раз, чтобы перемешать содержимое.
-  **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**
Использование свежеприготовленного раствора NaOH важно для денатурации PhiX в целях образования кластеров на генетическом секвенаторе MiSeqDx.
- 3 Для получения разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) объедините следующие объемы:
 - ✦ контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) (2 мкл)
 - ✦ 1X Буфер TE (8 мкл)
 - 4 Для получения денатурированного разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) объедините следующие объемы:
 - ✦ Разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) (10 мкл)
 - ✦ 0,1 N раствор NaOH (10 мкл)
 - 5 Кратковременно перемешайте денатурированный разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) на вортексе.
 - 6 Кратковременно центрифугируйте денатурированный разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control), чтобы собрать содержимое.

- 7 Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре для денатурации контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) до отдельных нитей.
- 8 Для получения раствора PhiX в буфере для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) объедините следующие объемы буфера для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) и денатурированного разведенного контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control).
 - Денатурированный разведенный контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) (20 мкл)
 - Предварительно охлажденный буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) (980 мкл)

Визуальная проверка картриджа с реагентами

- 1 Переверните картридж с реагентами десять раз, чтобы перемешать оттаявшие реагенты, а затем проверьте, что оттаяли все положения.



ПРИМЕЧАНИЕ
Для качественного секвенирования важно, чтобы реагенты в картридже полностью оттаяли и были однородными.
- 2 Проведите визуальный осмотр реагентов в положениях 1, 2 и 4, чтобы убедиться, что они полностью однородны и не содержат осадков.
- 3 Осторожно постучите картриджем по столу, чтобы устранить пузырьки воздуха в реагентах.



ПРИМЕЧАНИЕ
Трубки системы подачи образцов MiSeqDx доходят до дна каждого резервуара для отбора реагентов, поэтому важно, чтобы в резервуарах не было пузырьков воздуха.
- 4 До готовности к началу прогона поместите картридж с реагентами на лед или держите при температуре от 2 °C до 8 °C (до 6 часов). Для получения лучших результатов, переходите непосредственно к загрузке образца и запуску прогона.

Подготовка образцов для секвенирования

- 1 Доведите буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) до комнатной температуры. Перемешайте на вортексе и убедитесь, что все осадки полностью растворились.
- 2 Центрифугируйте планшеты **SGP** при 1000 × g при комнатной температуре в течение 1 минуты.
- 3 Извлеките из упаковки новую центрифужную микропробирку (далее обозначенную как пробирка **PAL**).
- 4 Определите образцы для объединения, которые предназначены для секвенирования. На каждый прогон секвенирования максимально можно объединить 12 образцов/24 библиотеки.
- 5 Перенесите по 10 мкл каждой библиотеки для секвенирования из планшета **SGP**, колонку за колонкой, в стрип для ПЦР на восемь пробирок. Запечатйте планшет **SGP** клеящейся пленкой для планшетов.
- 6 Объедините и перенесите содержимое стрипа для ПЦР на восемь пробирок в пробирку **PAL**. Тщательно перемешайте содержимое пробирки **PAL**.
- 7 Извлеките из упаковки 3–6 новых центрифужных микропробирок (далее обозначенных как пробирка **DAL**).
- 8 Добавьте в каждую пробирку **DAL** 784 мкл буфера для разведения библиотек (Library Dilution Buffer).
- 9 Добавьте в каждую пробирку **DAL** 8 мкл раствора контроля внутреннего PhiX (PhiX Internal Control) в буфере для разведения библиотек (Library Dilution Buffer). Перемешайте пипеткой (3–5 раз вверх и вниз), чтобы промыть наконечник и гарантировать полный перенос.
- 10 Перенесите в каждую пробирку **DAL**, содержащую буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer), по 8 мкл из пробирки **PAL**. Перемешайте пипеткой (3–5 раз вверх и вниз), чтобы промыть наконечник и гарантировать полный перенос.
- 11 Перемешайте содержимое пробирки **DAL** на вортексе при максимальной скорости.



ПРИМЕЧАНИЕ

Разведенную библиотеку **DAL** можно хранить при температуре от -25 °C до -15 °C в течение 30 суток.

12 Центрифугируйте одну пробирку **DAL** при комнатной температуре в течение 1 минуты, чтобы собрать содержимое.

13 Инкубируйте пробирку **DAL** в термоблоке при 96 °C в течение 2 минут.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Соблюдайте осторожность при извлечении пробирки. Пробирка и термоблок могут быть горячими.

14 После инкубации переверните пробирку **DAL** 1–2 раза, чтобы перемешать содержимое, затем сразу перенесите на ледяную баню.

15 Выдержите пробирку **DAL** на ледяной бане в течение 5 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ

Чтобы гарантировать эффективную загрузку матрицы в ячейку проточную MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell), стадию термической денатурации необходимо выполнять непосредственно перед загрузкой содержимого **DAL** в картридж с реагентами MiSeqDx. Пробирки **DAL** с повторностями необходимо подвергать термической денатурации непосредственно перед загрузкой генетического секвенатора MiSeqDx.

Секвенирование библиотеки

Методика

Подробное описание перечисленных выше стадий см. в документе Руководство справочное прибора генетический секвенатор MiSeqDx для MOS (документ №1000000021961).

1 Чтобы проколоть прокладку-уплотнитель с мембраной из алюминиевой фольги над резервуаром на картридже MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3), с маркировкой **Загрузка образцов (Load Samples)**, используйте чистый наконечник для пипетки на 1 мл.

2 Перенесите пипеткой 600 мкл библиотеки DAL в резервуар **Загрузка образцов (Load Samples)**. Старайтесь избегать касания прокладки-уплотнителя с мембраной из алюминиевой фольги при внесении образца.

3 Проверьте наличие пузырьков воздуха в резервуаре после загрузки образца. При наличии пузырьков воздуха осторожно постучите картриджем по столу, чтобы выпустить пузырьки.

4 Введите имя пользователя и пароль в операционное программное обеспечение MiSeq (MOS), используя программу Local Run Manager.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если в программу загружены данные предыдущего пользователя, перед загрузкой данных выберите команду «**Выйти из системы**» (Log Off). Подтвердите, что отображается правильное имя пользователя или регистрационные данные

5 На главной странице выберите «**Последовательность**» (Sequence).

6 Выберите прогон из перечня.

7 Подтвердите установку параметров прогона.

8 Очистите ячейку проточную.

9 Загрузите ячейку проточную.

10 Опорожните флакон с отходами и загрузите флакон с буфером MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))

11 Загрузите картридж с реагентами.

12 Прогон запускается автоматически после прохождения предварительной проверки.

13 Выполните промывку после прогона.

Просмотр результатов анализа

- 1 Нажмите кнопкой мыши название прогона на панели управления программы Local Run Manager.
- 2 Чтобы вывести на экран отчет об анализе, нажмите таблицу «Образцы и результаты» (Samples and Results).
Если анализ был проведен повторно, разверните контекстный список «Выбор анализа» (Select Analysis) и выберите соответствующий анализ.
- 3 [Необязательно] Нажмите кнопкой мыши пиктограмму «Копировать в буфер обмена» (Copy to Clipboard), чтобы скопировать путь сохранения в папке «Анализ».

Интерпретация результатов

- 1 Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel компании «Иллюмина» предназначен для обнаружения мутаций *KRAS* и *NRAS*, перечисленных в таблице 1.
- 2 Сводные результаты анализа представлены в таблице «Образцы и результаты». Отчет также можно экспортировать.

Отчет об анализе

В отчете об анализе данных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel подробно описано, успешно ли прошел прогон, и содержит ли каждый исследуемый образец какую-либо из 56 мутаций RAS.

«Статус прогона» (Run State) в таблице «Образцы и результаты» (Samples and Results) показывает, соответствует ли прогон секвенирования параметрам качества. Если в статусе прогона указано «не прошел» (Fail), все образцы будут отмечены как недействительные.

Результаты анализа исследуемых образцов

Таблица результатов анализа образцов

Заголовок столбца	Описание
Название образца	Название образца указывают при создании прогона.
Образец	Результаты исследуемых образцов по валидности. Действителен (Valid) — указано наличие или отсутствие мутаций панели. Недействителен (Invalid) — наличие или отсутствие мутаций панели определить невозможно. См. <i>Образцы недействительны на странице 25</i> .
Результат	Результаты определения мутаций панели в исследуемых образцах. См. <i>Мутации панели обозначены на странице 25</i> и <i>Мутаций панели не выявлено на странице 25</i> .
Ген	Ген, <i>KRAS</i> или <i>NRAS</i> , в котором выявлена мутация, если применимо.
Экзон	Номер экзона, в котором присутствует мутация, если применимо.
Аминокислота	Обозначение аминокислотной замены по номенклатуре Общества по исследованию вариаций генома человека (HGVS; Human Genome Variation Society).
Нуклеотид	Обозначение нуклеотидной замены по HGVS.

Образец недействителен

Результат образца «Недействителен» показывает, что наличие или отсутствие мутации RAS невозможно определить. Для образцов, определенных как недействительные, повторите приготовление библиотеки, секвенирование и анализ. Если секвенирование образца не проходит 2 раза, может быть необходимым

провести дополнительный поиск и устранение неисправностей. Если все образцы в прогоне недействительны в связи со статусом прогона «Не прошел», обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина».

Мутация панели выявлена

Результат образца «Мутация панели выявлена» показывает, что обнаружена мутация RAS. В отчете приведен список всех выявленных мутаций.

Мутаций панели не выявлено

Результат образца «Мутаций панели не выявлено» показывает, что мутаций RAS не обнаружено.

Методики контроля качества

Правила надлежащей лабораторной практики требуют проведения оценки контрольного материала для выявления различий в обработке и технических методиках в лаборатории пользователя, которые могут привести к существенной вариативности результатов.

- 1 **Положительные контроли (контроль панели)** — контроль панели необходим при каждом прогоне. Контроль панели имеет 2 мутации — *KRAS* экзон 2 p.Gly12Asp c.35G>A и *NRAS* экзон 3 p.Gln61Lys c.181C>A. Чтобы контроль панели был действительным, должен быть получен ожидаемый генотип. Если контроль недействителен, могли возникнуть ошибки при обработке. Программное обеспечение не сможет полностью выполнить прогон секвенирования, и все образцы окажутся недействительными.
- 2 **Отрицательный контроль (без матрицы/без ДНК)** — использование отрицательного контроля (без матрицы/без ДНК) (холостая проба) необходим при каждом прогоне. Чтобы прогон был действительным, холостая проба должна выглядеть как недействительная. Если в холостой пробе получен неожиданный результат, программное обеспечение не сможет полностью выполнить прогон секвенирования, и все образцы окажутся недействительными.
- 3 Перед применением данного анализа в лаборатории следует выполнить проверку производительности анализа путем тестирования различных положительных и отрицательных образцов с известными характеристиками производительности.
- 4 Все требования к контролю качества должны быть выполнены в соответствии с местными, государственными и/или федеральными предписаниями или требованиями аккредитации.
- 5 Если прогон секвенирования не прошел, обратитесь в службу технической поддержки компании «Иллюмина» для поиска и устранения неисправностей прогона.

Характеристики производительности

Определения всех расчетов, используемых при характеристике производительности

Процент соответствия образцов требованиям контроля качества (КК образца): процент соответствия образцов требованиям контроля качества определяют как процент образцов, соответствующих спецификации контроля качества образца ($dCq \leq 5$).

Процент успешного прохождения первого прогона образца: процент успешного прохождения первого прогона образца определяют как процент образцов, для которых получен действительный результат при первом прогоне.

Расчет согласования: набор реагентов Praxis Extended RAS Panel предназначен для специфического обнаружения 56 мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*. Набор позволяет одновременно определять наличие или отсутствие каждой из 56 мутаций в каждом секвенируемом образце. Стандартом для расчетов соответствия является двунаправленное секвенирование по Сэнгеру или, если указано, контрольное условие.

- 1 **Общий процент соответствия (OPA; Overall percent agreement)** рассчитывают как результат

деления количества мутантных и немутантных положений, которые согласуются со стандартом, на общее количество возможных мутантных и немутантных положений для всех действительных повторностей. ОРА рассчитывают для каждой мутации с учетом существующих 56 мутаций на один образец. Общий процент соответствия рассчитывали, как показано ниже:

$$\frac{(\text{кол-во образцов} \times 56 \text{ мутантных и немутантных положений, совпадающих с положениями стандартного образца})}{(\text{кол-во образцов} \times \text{общее кол-во 56 мутантных и немутантных положений})} = \text{ОРА.}$$

2. Процент положительного соответствия (PPA; Positive Percent Agreement) рассчитывают как 100% количество верных определений положительных результатов (мутантных положений, совпадающих с соответствующими положениями стандартного образца), деленное на сумму количества верных положительных результатов и количества ложно отрицательных результатов для каждой мутации. Процент положительного соответствия рассчитывали, как показано ниже:

$$\frac{(\text{кол-во мутантных положений} \times \text{кол-во повторностей})}{(\text{кол-во верных положительных результатов} + \text{кол-во ложно отрицательных результатов})} = \text{PPA}$$
3. Процент отрицательного соответствия (NPA; Negative Percent Agreement) рассчитывают как 100% количество верных определений отрицательных результатов (мутантных положений, совпадающих с соответствующими положениями стандартного образца), деленное на сумму количества верных отрицательных результатов и количества ложно отрицательных результатов. NPA рассчитывают для каждой мутации с учетом существующих 56 мутаций на один образец. Процент отрицательного согласия рассчитывали, как показано ниже:

$$\frac{(\text{кол-во образцов дикого типа} \times \text{кол-во повторностей} \times 56 \text{ немутантных положений}) + (\text{кол-во мутантных образцов} \times \text{кол-во повторностей} \times \text{кол-во немутантных положений})}{(\text{кол-во верных отрицательных результатов} + \text{кол-во ложно положительных результатов})} = \text{NPA}$$
4. Процент верных определений (PCC; Percent Correct Call) рассчитывают как 100% количество верных определений, деленное на количество предпринятых определений. Этот термин используют для определения воспроизводимости. Такой же расчет описан как процент соответствия (процент положительного или отрицательного соответствия) в других аналитических исследованиях.

Расчеты доверительных интервалов: Расчеты нижних границ односторонних 95% доверительных интервалов и 2-сторонних 95% доверительных интервалов были выполнены по методу Клоппера-Пирсона (строгого соответствия биномиальному распределению) для аналитических или клинических исследований или по методу суммарной оценки Вильсона (где указано) в клинических исследованиях.

Аналитическая точность – сравнение с ортогональным методом

Образцы фиксированных формалином, залитых в парафин (FFPE) тканей из банка тканей, собранные в исследовании панитумумаба, проведенном компанией «Амген» (Amgen) (номер протокола 20050203 [исследование '203]), были протестированы с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Оценка образцов была также выполнена методом сравнения — двунаправленным секвенированием по Сэнгеру (Sanger). Для оценки точности методики с использованием набора реагентов Praxis Extended RAS Panel проводили сравнение соответствий между результатами, полученными с использованием набора реагентов Praxis Extended RAS Panel и секвенирования по Сэнгеру.

Статус RAS на уровне субъекта считали положительным, если у субъекта обнаруживали по меньшей мере одну мутацию. Статус RAS на уровне субъекта считали отрицательным, если мутаций не обнаруживали. Процент положительного соответствия (PPA) рассчитывают как 100% верных определений субъектов с положительным результатом, деленное на сумму количества субъектов с верным положительным результатом и количества субъектов с ложно отрицательным результатом. Процент отрицательного соответствия (NPA; Negative Percent Agreement) рассчитывают как 100% верных определений субъектов с отрицательным результатом, деленное на сумму количества субъектов с верным отрицательным результатом и количества субъектов с ложно отрицательным результатом. Двусторонние 95% доверительные интервалы рассчитывают по методу Клоппера-Пирсона (строгого соответствия биномиальному распределению).

Из 1183 участников исследования следующие участники были исключены из анализа точности (комбинации

секвенирования по Сэнгеру и с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel): у 358 образцы ткани не были получены, у 127 площадь ткани была недостаточной, и у 13 было недостаточное количество опухолевых клеток. Из остальных 685 участников исследования 214 участника были исключены в связи со значением $dCq > 5,0$, 1 в связи с не подлежащим оценке значением dCq , еще 28 — в связи с неудачным контролем качества MiSeqDx и, наконец, 1 участник был исключен в связи с ошибкой при обработке образца/остановкой прогона. Для оставшегося 441 участника были получены достоверные результаты секвенирования по Сэнгеру и с помощью расширенной панели RAS Praxis и проведено их сравнение.

При оценке на уровне субъекта (таблица 15) у 230 из 441 участника исследования были получены положительные результаты определения RAS по методу Сэнгера (мутация, выявленная по методу Сэнгера); у 227 из них были получены положительные результаты определения RAS с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. У остальных 211 из 441 участника исследования были получены отрицательные результаты определения RAS по методу Сэнгера (методом Сэнгера мутаций не было выявлено); у 206 из них были получены отрицательные результаты определения RAS с помощью расширенной панели RAS Praxis. В результате значение PPA составляло 98,7%, а NPA — 97,6%.

Процент положительного и отрицательного соответствия результатов определения RAS на уровне субъекта

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel	Метод Сэнгера		Итого
	Положительный результат	Отрицательный результат	
Положительный результат	227*	5	232
Отрицательный результат	3**	206	209
Итого	230	211	441

Сводные характеристики производительности		
Статистическая оценка согласия	Точечная оценка	Точный 95% ДИ
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%, 99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%, 99,2%]

*При оценке по всем мутациям на внутрисубъектном уровне было получено 224 точных совпадения; для 2 участников исследования система MiSeqDx выявила мутацию, определенную по методу Сэнгера, и 1 дополнительную мутацию; для 1 участника исследования MiSeqDx и Сэнгер выявили различные мутации.

**У 1 участника выявлено 2 мутации методом Сэнгера; У 2 участников выявлена 1 мутация методом Сэнгера.

Оценка данных была также проведена на уровне мутации и обозначена как верная положительная (TP, true positive), верная отрицательная (TN, true negative), ложно положительная (FP, false positive) и ложно отрицательная (FN, false positive). В таблице 16 и таблице 17 представлены значения PPA и NPA для каждой мутации вместе с 95% доверительным интервалом по методу Клоппера-Пирсона (точного соответствия биномиальному распределению).

Таблица 16. Процент положительного и отрицательного соответствия результатов определения на уровне мутации в гене KRAS ($dCq \leq 5,0$)

Локализация	Мутация	TP	FN	FP	TN	Итого	PPA (95% ДИ)	NPA (95% ДИ)
KRAS экзон 2	c.34G>T	14	0	0	426	440	100,0 (76,8–100,0)	100,0 (99,1–100,0)
	c.34G>A	9	1	0	430	440	90,0 (55,5–99,7)	100,0 (99,1–100,0)
	c.34G>C	0	0	0	440	440	NE ¹	100,0 (99,2–100,0)
	c.34_35GG>TT	1	0	0	439	440	100,0 (2,5–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.34_35GG>AA	0	0	0	440	440	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.34_36GGT>TGG	0	0	0	440	440	NE	100,0 (99,2–100,0)

KRAS экзон 3	c.35G>A	55	0	1	384	440	100,0 (93,5–100,0)	99,7 (98,6–100,0)
	c.35G>T	40	2	2	396	440	95,2 (83,8–99,4)	99,5 (98,2–99,9)
	c.35G>C	11	0	2	427	440	100,0 (71,5–100,0)	99,5 (98,3–99,9)
	c.37G>T	2	0	0	438	440	100,0 (15,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.37G>C	0	0	0	440	440	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.38G>A	41	0	0	399	440	100,0 (91,4–100,0)	100,0 (99,1–100,0)
	c.38_39GC>TT	0	0	0	440	440	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.38_39GC>AA	0	0	0	440	440	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.38_39GC>AT	0	0	0	440	440	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.175G>A	1	0	0	440	441	100,0 (2,5–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.176C>G	1	0	0	440	441	100,0 (2,5–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.181C>A	0	1	0	440	441	0,0 (0,0–97,5)	100,0 (99,2–100,0)
	c.181C>G	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.182A>T	1	0	0	440	441	100,0 (2,5–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.182A>G	2	0	0	439	441	100,0 (15,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.183A>C	6	0	0	435	441	100,0 (54,1–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.183A>T	1	0	0	440	441	100,0 (2,5–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
KRAS экзон 4	c.351A>C	2	1	0	437	440	66,7 (9,4–99,2)	100,0 (99,2–100,0)
	c.351A>T	2	0	0	438	440	100,0 (15,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.436G>A	11	0	0	429	440	100,0 (71,5–100,0)	100,0 (99,1–100,0)
	c.436G>C	1	0	0	439	440	100,0 (2,5–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.437C>T	3	0	0	437	440	100,0 (29,2–100,0)	100,0 (99,2–100,0)

* NE = не подлежит оценке (not estimable)

Процент положительного и отрицательного соответствия результатов определения на уровне мутации в гене NRAS (dCq ≤ 5,0)

Локализация	Мутация	TP	FN	FP	TN	Итого	PPA (95% ДИ)	NPA (95% ДИ)
NRAS экзон 2	c.34G>T	1	0	1	439	441	100,0 (2,5–100,0)	99,8 (98,7–100,0)
	c.34G>A	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.34G>C	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.34_35GG>TT	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.34_35GG>AA	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.34_36GGT>TGG	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.35G>A	4	0	0	437	441	100,0 (39,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.35G>T	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.35G>C	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.37G>T	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.37G>C	2	0	0	439	441	100,0 (15,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.38G>A	0	0	1	440	441	NE	99,8 (98,7–100,0)
	c.38G>T	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.38_39GT>AA	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.38_39GT>AG	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)

NRAS экзон 3	c.175G>A	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.176C>G	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.181C>A	7	0	1	433	441	100,0 (59,0–100,0)	99,8 (98,7–100,0)
	c.181C>G	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.182A>T	2	0	0	439	441	100,0 (15,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.182A>G	5	0	0	436	441	100,0 (47,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
	c.183A>C	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.183A>T	2	0	0	439	441	100,0 (15,8–100,0)	100,0 (99,2–100,0)
NRAS экзон 4	c.351G>C	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.351G>T	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.436G>A	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.436G>C	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)
	c.437C>T	0	0	0	441	441	NE	100,0 (99,2–100,0)

* NE = не подлежит оценке

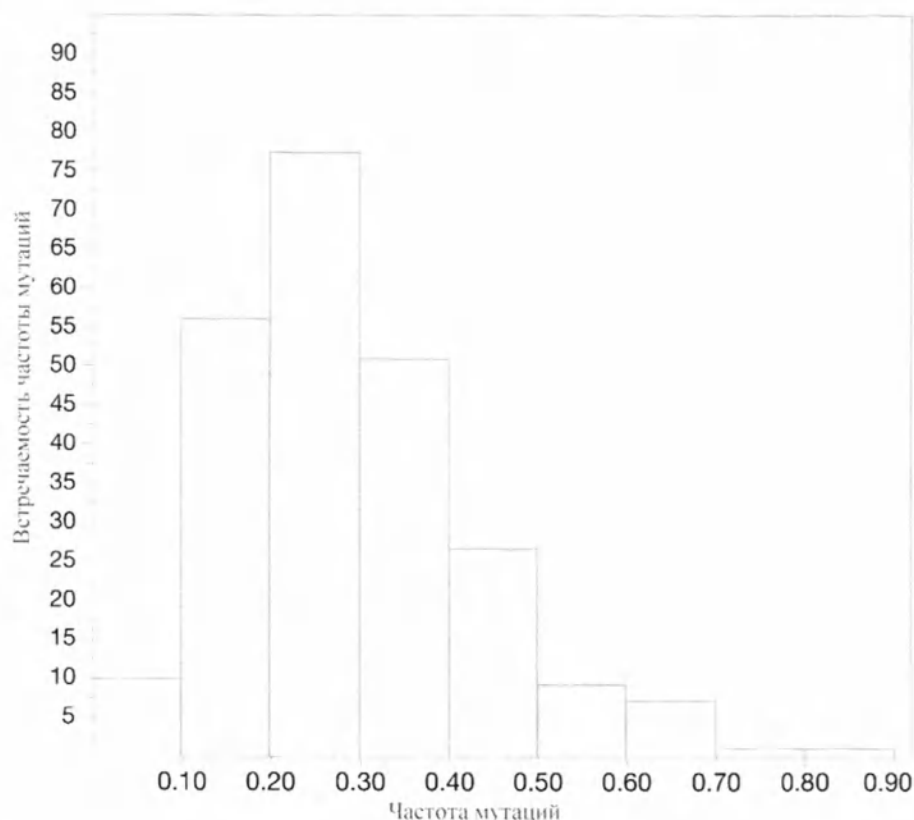
Значения общего PPA и NPA, рассчитанные на уровне мутации, для каждого гена и для обоих генов (итого), представлены в таблице 18. Двусторонние 95% доверительные интервалы для PPA и NPA рассчитывают по методу Клоппера-Пирсона (строгого соответствия биномиальному распределению).

Общий процент положительного и отрицательного соответствия результатов определения по каждой мутации

Локализация/мутация	TP	FN	FP	TN	Итого	PPA (95% ДИ)	NPA (95% ДИ)
KRAS/все	204	5	5	12114	12328	97,6 (94,5–99,2)	99,96 (99,9–100,0)
NRAS/все	23	0	3	12322	12348	100 (85,2–100,0)	99,98 (99,9–100,0)
Итого	227	5	8	24436	24676	97,8 (95,0–99,3)	99,97 (99,9–100,0)

На рисунке 7 показано распределение частот мутаций, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. На рисунке 7 показано распределение частот мутаций, экспериментально определенных в исследовании 203 в образцах с положительным результатом теста при использовании образцов FFPE, содержащих $\geq 50\%$ опухолевой ткани. Показано, что в большинстве образцов частоты мутаций находятся в диапазоне от 0,15 до 0,35. У 14,9% участников исследования частота мутаций составляла $<0,15$, а у 55,3% участников исследования частота мутаций составляла $\geq 0,15$ и $\leq 0,35$.

Рисунок 7. Распределение частот мутаций, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel в образцах с положительным результатом (n=235)



Кросс-табуляция результатов определения на уровне мутации, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel и секвенированием по Сэнгеру, представлены в сводном виде в таблице несоответствий результатов секвенирования по Сэнгеру и с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (см. таблицу 19). Было получено 445 положительных результатов сравнения между мутациями, определенными секвенированием по Сэнгеру и/или с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel для 441 подлежащего оценке участника исследования в выборке подлежащих оценке анализов RAS. У четырех (4) участников исследования было выявлено две мутации с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel, секвенированием по Сэнгеру или обоими методами; поэтому количество результатов на уровне мутации ($n=445$) превышает количество участников исследования ($n=441$).

Значения по диагонали таблицы представляют собой результаты, согласующиеся на уровне мутации (обоими методами определена одна и та же мутация или обоими методами мутаций не выявлено). Значения вне диагонали представляют собой не согласующиеся результаты. По большинству результатов оба метода согласуются (434/445, 97,5%); из них получено 206 результатов отсутствия выявленных мутаций (отрицательных). В столбце отрицательных результатов, полученных методом Сэнгера, в 5 случаях отмечены мутации (FP), выявленные с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (например, в 1 образце, в котором методом Сэнгера мутаций не выявлено, с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel выявлена мутация *KRAS* экзон 2 с35G>A). В строке отрицательных результатов для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel было отмечено 4 случая (FN) мутаций, выявленных методом Сэнгера (например, в 1 образце, в котором для панели RAS мутаций не выявлено, методом Сэнгера выявлена мутация *KRAS* экзон 2 с34G>A).

Результаты, соответствующие 4 участникам исследования, у которых было выявлено 2 мутации методом Сэнгера и/или набором реагентов Praxis Extended RAS Panel, отмечены в сносках к таблице несоответствий, приведенной в таблице 19.

Таблица несоответствия результатов секвенирования по Сэнгеру и с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel

		МЕТОД СЕНГЕРА																												Отрицательный результат	Итого	
		KRAS экзон 2				KRAS экзон 3				KRAS экзон 4				NRAS экзон 2				NRAS экзон 3														
Расширенная панель RAS MiSeqDx		c.34G>T	c.34G>A	c.34_35GG>TT	c.35G>A	c.35G>T	c.35G>C	c.37G>T	c.38G>A	c.175G>A	c.176C>G	c.181C>A	c.182A>T	c.182A>G	c.183A>C	c.183A>T	c.351A>C	c.351A>T	c.436G>A	c.436G>C	c.437C>T	c.34G>T	c.35G>A	c.37G>C	c.38G>A	c.181C>A	c.182A>T	c.182A>G	c.183A>T			
Расширенная панель RAS MiSeqDx	KRAS экзон 2	14 ¹	0	1																												
	c.34G>T	14 ¹																												14		
	c.34G>A		0																											0		
	c.34_35GG>TT			1																										1		
	c.35G>A				55																									56		
	c.35G>T				40				1 ¹																					41		
	c.35G>C	1 ¹				11																								12		
	c.37G>T							2																						2		
	c.38G>A								41 ^{1,4}																						41	
	c.175G>A									1																					1	
	c.176C>G										1																				1	
	c.181C>A											0																			0	
	c.182A>T												1																		1	
	c.182A>G													2																2	2	
	c.183A>C														6																6	
	c.183A>T															1															1	
	c.351A>C																2														2	
	c.351A>T																	2													2	
	c.436G>A																		11												11	
	c.436G>C																			1											1	
	c.437C>T																				3										3	
NRAS экзон 2	c.34G>T																					1								1	2	
	c.35G>A																						3 ¹								4	
	c.37G>C																							2							2	
	c.38G>A																1									0					1	
	NRAS экзон 3	c.181C>A																									7					8
		c.182A>T																										2				2
		c.182A>G																											5			5
		c.183A>T																												2		2
Отрицательный результат	1 ¹			2 ⁰							1																		206	210		
Итого	15	10	1	55	42	11	2	42	1	1	1	1	2	6	1	3	2	11	1	3	1	4	2	0	7	2	5	2	211	445		

Результаты А, В, С и D, указанные в сноске, получены для 4 участников исследования и имеют значения в ячейке таблицы

^А Участник, у которого методом Сэнгера выявлено 2 мутации (*KRAS* экзон 2 с.34G>А и *KRAS* экзон 2 с.35G>Т), а с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel мутаций не выявлено.

^В Участник, у которого методом Сэнгера выявлена 1 мутация (*KRAS* экзон 2 с.34G>Т), а с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel выявлена та же мутация и дополнительная мутация (*KRAS* экзон 2 с.34G>Т и *KRAS* экзон 2 с.35G>С).

^С Участник, у которого методом Сэнгера выявлена 1 мутация (*KRAS* экзон 2 с.38G>А), а с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel выявлена та же мутация и дополнительная мутация (*KRAS* экзон 2 с.38G>А и *KRAS* экзон 2 с.35G>Т).

^D Участник, у которого методом Сэнгера выявлено две мутации (*KRAS* экзон 2 с.38G>А и *NRAS* экзон 2 с.35G>А), а с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel выявлены те же мутации (*KRAS* экзон 2 с.38G>А и *NRAS* экзон 2 с.35G>А).

Аналитическая чувствительность (диапазон вносимой ДНК)

Последовательность действий по проведению анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel включает в себя оценку качества исследуемых образцов, приготовление библиотеки и секвенирование. Качество образцов геномной ДНК оценивают путем количественного определения амплифицируемости образца относительно контрольной ДНК-матрицы методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Определение амплифицируемости позволяет оценить как количество, так и качество образца ДНК для оценки качества. Пороговое значение количественного определения (Cq) получают, используя матрицу контроля качества и каждый образец геномной ДНК. Мерой оценки амплифицируемости является изменение порога количественного определения (Cq) между исследуемым образцом и контрольной ДНК-матрицей (дельта Cq; dCq). Значение dCq используют, чтобы определить, пригодно ли качество исследуемого образца для анализа с помощью расширенной панели RAS Praxis, для которого оно является мерой качества и количества ДНК (ввода ДНК). Приемлемым значением для данного анализа является дельта Cq ≤ 5 .

Для оценки производительности анализа ввод ДНК оценивали в диапазоне значений Cq от -0,5 до 5. Уровень дельта Cq от -0,5 до 5 соответствует количеству используемой в этом анализе интактной ДНК, составляющему приблизительно от 1200 нг до 25 нг соответственно.

Оценку проводили для панели из 9 FFPE образцов CRC, каждый из которых содержал 1 уникальную мутацию по перечню из набора реагентов Praxis Extended RAS Panel, и 1 FFPE образца CRC дикого типа по отношению к мутациям из перечня набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Были представлены мутации, находящиеся в экзонах 2, 3 и 4 гена *KRAS* и в экзонах 2 и 3 гена *NRAS*. Частота мутаций для этой панели находилась в диапазоне приблизительно от 10% до 20%.

Панель образцов тестировали в двух повторностях препаратов библиотеки для каждого уровня ввода ДНК, при этом при каждом уровне ввода ДНК результаты регистрировали в общей сложности 20 раз. Максимальный уровень мультиплексирования для секвенируемых образцов соответствовал 10 исследуемым образцам вместе с контрольными образцами на один прогон. Было протестировано два (2) уровня ввода ДНК: 1) dCq от -0,5 до 0,5 (номинальный верхний предел) 2) dCq от 4 до 5 (номинальный нижний предел).

Все образцы для каждого уровня ввода ДНК показали действительный результат после приготовления библиотеки и секвенирования при 100%-ном первом успешном прогоне образца (20/20). ОРА, РРА и НРА рассчитывают для каждой мутации с учетом существующих 56 мутаций на один образец. Общий процент соответствия относительно метода секвенирования по Сэнгеру составлял 100% (1120/1120) для каждого уровня ввода ДНК. Процент положительного соответствия относительно метода секвенирования по Сэнгеру составлял 100% (18/18), а процент отрицательного соответствия составлял 100% (1102/1102) для каждого уровня ввода ДНК. Таким образом, в этом исследовании производительность анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel продемонстрирована для дельта Cq (ввода ДНК) в диапазоне от -0,5 до 5.

Чтобы показать производительность для проблемных образцов, несущих мутации с частотой мутантного аллеля, приближенной к пределу обнаружения (ПО), было проведено дополнительное исследование. Поскольку качество ДНК оценивают на основании точки отсечения dCq, равной 5,0, для оценки был выбран номинальный диапазон концентрации вводимой ДНК (от 12,5 нг до 50 нг), соответствующий приблизительным значениям dCq 6-4. Использовали панель из 5 перемешанных смесей FFPE образцов CRC, каждый из которых содержал 2 уникальные репрезентативные мутации из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel: одну с низким (приблизительно 8%) и одну с высоким (приблизительно 14%) уровнем частоты мутации. В два (2) из пяти (5) смесей образцов вносили мультинуклеотидный вариант (MNV) панели RAS с известной концентрацией. Для оценки каждой смеси FFPE образцов использовали два уровня ввода ДНК: уровень dCq 4-5 соответствует приблизительно 50-25 нг соответственно, а уровень dCq 5-6 соответствует 25-12,5 нг соответственно интактной ДНК. Результаты для каждой из 5 смесей образцов регистрировали двенадцать (12) раз в течение 3 дней, идущих не подряд, на один уровень ввода ДНК/дельта Cq и частоты мутации. На протяжении всего исследования результаты для всех смесей образцов регистрировали в общей сложности 60 раз; для всех уровней частоты мутации на один уровень ввода ДНК результаты регистрировали 120 раз (2 регистрации результатов $\times$ 2 прибора [прогона секвенирования] $\times$ 3 идущих не подряд дня $\times$ 5 смесей). Процент успешного первого прогона образца составлял 100% (60/60) для dCq от 4 до 5 и 91,7% (55/60) для dCq от 5 до 6. Для dCq от 4 до 5 100% (120/120) зарегистрированных результатов показали ожидаемую мутацию из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel. Для

dCq от 5 до 6 95% (114/120) зарегистрированных результатов показали ожидаемую мутацию из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel. Средние значения частоты мутации были сходными между уровнями дельта Cq, при этом в образцах с дельта Cq от 5 до 6 вариабельность частоты мутаций в целом была больше, чем для тех же образцов с дельта Cq от 4 до 5. В исследовании подтвердили, что мутации, частота которых приближена к ПО, могут быть определены с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel при вводе ДНК, соответствующем dCq $\leq 5,0$ и приблизительно 25 нг интактной ДНК.

Аналитическая чувствительность (предел холостой пробы [ПХП] и предел обнаружения [ПО])

ПО определяют как минимальную частоту аллеля, при которой легко определяется 95% образцов. Исследование предела холостой пробы (ПХП) и предела обнаружения (ПО) для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel было проведено с использованием 3 смесей FFPE образцов CRC, каждый из которых содержал 2 репрезентативные мутации из перечня набора реагентов Praxis Extended RAS Panel при 5 уровнях частоты мутаций (приблизительно 10%, 5%, 2,5%, 1,25% и 0%). Прогон этих смесей в двух повторностях с 2 различными товарными партиями реагентов выполняли 5 различных операторов в течение 2 идущих не подряд дней, регистрируя результаты в общей сложности 20 раз на одну смесь образцов на одну товарную партию. Общее количество регистраций результатов в исследовании для всех уровней и товарных партий реагентов составляет 600 раз (20 раз $\times$ 5 уровней $\times$ 3 смеси образцов $\times$ 2 товарные партии = 600 раз). Для тестирования ПО при предельной пропускной способности анализа образца все прогоны включали 10 образцов с контролями в одной проточной ячейке. Смесей образцов получали при низком уровне ввода ДНК (dCq=4–5). Диапазон результатов для 95% обнаружения каждой тестируемой мутации представлен в таблице 20. С использованием пробит-анализа определили ПО для 6 репрезентативных мутаций в диапазоне 4,2%–5,3% (таблица 20). В целом эти данные подтверждают заявленное значение 5%.

Предел обнаружения

Ген	Экзон	Мутация	ПО
KRAS	2	c.35 G>A	5,0%
NRAS	3	c.182 A>G	4,7%
KRAS	2	c.35 G>A	4,8%
KRAS	4	c.436 G>A	5,3%
KRAS	3	c.183 A>C	4,2%
NRAS	2	c.38_39 GT>AA	4,5%

Заявленный для данного анализа предел холостой пробы (ПХП) для каждой из 56 мутаций рассчитывали с использованием образцов дикого типа по отношению к мутациям панели RAS. В этом исследовании использовали три образца дикого типа (WT). В данном исследовании результаты регистрировали 60 раз для каждой исследуемой мутации на одну товарную партию (20 раз $\times$ 3 образца WT). В этом исследовании были использованы две товарные партии. Ложно положительных результатов не было получено. В одном из случаев частота мутации превышала пороговое значение, но мутация была выявлена только при использовании одного пула олигонуклеотидов и не подтверждена в других, поэтому она не была указана. Клиническое пороговое значение установлено как 2,6%.

Прецизионность

Прецизионность партий реагентов

Исследование прецизионности партий реагентов было проведено для сравнительной оценки набора реагентов Praxis Extended RAS Panel между товарными партиями производимых наборов реагентов. Три (3) партии набора реагентов тестировали с использованием панели из 5 смешанных FFPE образцов CRC. Каждый FFPE образец CRC содержал 2 уникальные репрезентативные мутации из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel: одну с низким (приблизительно 8%) и одну с высоким (приблизительно 14%) уровнем частоты мутации. Результаты для каждой из 5 смесей образцов регистрировали двенадцать (12) раз в течение 3 дней, идущих не подряд, с 3-мя партиями набора реагентов.

На протяжении всего исследования результаты для всех смесей образцов регистрировали в общей сложности 180 раз; для всех уровней частоты мутации результаты регистрировали 360 раз. Для всех партий и дней 99,7% (359/360) зарегистрированных результатов показали ожидаемую мутацию из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel. Одна мутация с низкой частотой была неверно определена как дикий тип. Для оценки вариабельности системы для каждой мутации/каждого уровня частоты мутаций проводили дисперсионный компонентный анализ. Общие стандартные отклонения находились в диапазоне от 0,011 до 0,029. Компонент общего стандартного отклонения, представляющий собой стандартное отклонение для партии набора реагентов, находился в диапазоне от 0 до 0,015.

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel было проведено внешнее исследование воспроизводимости для 3 независимых мест проведения исследования (2 оператора в одном месте проведения исследования), 1 партии реагентов и 3 дней тестирования, идущих не подряд. Тестирование проводили с 6 хорошо охарактеризованными панелями образцов геномной ДНК из клинических FFPE образцов или линий клеток. Каждая панель состояла из 10 образцов, всего было использовано 60 образцов для всех панелей.

В состав 60 образцов панели входили по две повторности 4 уникальных образцов дикого типа (по отношению к мутациям панели RAS), 12 уникальных мутантных образцов с одиночной мутацией, полученных как при высоком, так и при низком уровне частоты мутации, и 2 уникальных образца с одиночной мутацией, полученных только при низком уровне частоты мутации. Для каждого уникального исследуемого образца/образца уровня частоты мутаций, тестируемого в каждом прогоне в двух повторностях, должно быть получено 36 положительных результатов (2 повторности $\times$ 2 оператора $\times$ 3 дня $\times$ 3 места проведения исследования), если все результаты действительны. Значения дельта Cq для каждого из образцов панели анализа воспроизводимости находились в диапазоне от 3,64 до 4,08.

Оценку процента точных определений (PCC; Percent Correct Call) для всех мутантных образцов и образцов дикого типа проводили путем сравнения результата определения с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel с ожидаемым результатом определения мутации (обнаружена или не обнаружена ожидаемая мутация) в каждом образце. PCC рассчитывают как 100% количество верных определений, деленное на количество предпринятых определений. Двусторонние 95% доверительные интервалы рассчитывают по методу суммарной оценки Вильсона.

Качественная оценка воспроизводимости

При объединении данных для мест проведения исследования процент успешного прогона для первого прогона образца или в образцах, тестируемых в прогонах, которые были действительны с первого раза, составлял $\geq 94,7\%$. Процент точных определений (PCC) на уровне мутации для всех мутаций во всех мутантных образцах составлял 99,6% (905/909) за исключением данных неудачных образцов. Количество предпринятых определений для всех 56 мутаций панели независимо от того, была ли обнаруженная мутация ожидаемой, для всех действительных образцов составляло 58 856 (56×1051). Среди этих 58 856 экспериментальных результатов наблюдаемые и ожидаемые результаты, полученные на уровне мутаций, были несогласованными только в 6 случаях; PCC на уровне мутаций для всех объединенных мутантных образцов и образцов дикого типа составлял 99,99% (58 850/58 856).

В таблице 21 представлены значения PCC для каждого из 26 уникальных мутантных образцов/образцов уровня частоты мутаций (объединенные повторности для 2 образцов панели) и соответствующие 95%-е 2-сторонние суммарные ДИ.

Процент точных определений на уровне мутации для отдельных уникальных мутантных образцов/образцов уровня частоты мутаций (подлежащая оценке выборка анализа)

Уровень мутаций	Экзон	Замена аминокислоты	Замена основания	N	Процент точных определений (%)	95% ДИ ¹
Низкий	KRAS экзон 2	p.Gly12Cys	c.34G>T	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Gly12Arg	c.34G>C	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Gly12Ser	c.34G>A	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
		p.Gly12Ala	c.35G>C	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Gly12Val	c.35G>T	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
	KRAS экзон 2 (все образцы)			249	249/249 (100%)	(98,5, 100)
	KRAS экзон 3	p.Gln61His	c.183A>C	33	33/33 (100%)	(89,6, 100)
	KRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	35	33/35 (94,3%)	(81,4, 98,4)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
	KRAS экзон 4 (все образцы)			71	69/71 (97,2%)	(90,3, 99,2)
	KRAS (все экзоны)			353	351/353 (99,4%)	(98, 99,8)
	NRAS экзон 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	31	31/31 (100%)	(89, 100)
	NRAS экзон 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	33	33/33 (100%)	(89,6, 100)
	NRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	34/35 (97,1%)	(85,5, 99,5)
	NRAS экзон 4 (все образцы)			70	69/70 (98,6%)	(92,3, 99,7)
	NRAS (все экзоны)			134	133/134 (99,3%)	(95,9, 99,9)
	RAS (все экзоны)			487	484/487 (99,4%)	(98,2, 99,8)
Высокий	KRAS экзон 2	p.Gly12Arg	c.34G>C	33	33/33 (100%)	(89,6, 100)
		p.Gly12Ala	c.35G>C	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Gly12Val	c.35G>T	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
	KRAS экзон 2 (все образцы)			176	176/176 (100%)	(97,9, 100)
	KRAS экзон 3	p.Gln61His	c.183A>C	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
	KRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
	KRAS экзон 4 (все образцы)			71	71/71 (100%)	(94,9, 100)
	KRAS (все экзоны)			282	282/282 (100%)	(98,7, 100)
	NRAS экзон 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	34	34/34 (100%)	(89,8, 100)
	NRAS экзон 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	34	34/34 (100%)	(89,8, 100)
	NRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	36	35/36 (97,2%)	(85,8, 99,5)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
	NRAS экзон 4 (все образцы)			72	71/72 (98,6%)	(92,5, 99,8)
	NRAS (все экзоны)			140	139/140 (99,3%)	(96,1, 99,9)
	RAS (все экзоны)			422	421/422 (99,8%)	(98,7, 100)

Всего Все мутации панели 909 905/909 (99,6%) (98,9, 99,8)

⁽¹⁾ Двусторонние 95% доверительные интервалы рассчитывают по методу суммарной оценки Вильсона.

Процент точных определений на уровне образца для образцов дикого типа (показанная оценка выборка анализа)

Образец	N	Процент точных определений (%)	95% ДИ ¹
Дикий тип 1	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
Дикий тип 2	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
Дикий тип 3	36	36/36 (100%)	(90,4, 100)
Дикий тип 4	35	35/35 (100%)	(90,1, 100)
Всего	142	142/142 (100%)	(97,4, 100)

⁽¹⁾ Двусторонние 95% доверительные интервалы рассчитывают по методу суммарной оценки Вильсона.

представлены результаты компонентного дисперсионного анализа частоты мутаций и итоговая дисперсия для подлежащей оценке выборке анализа (для частоты мутаций). Результаты показаны для каждого уникального мутантного образца/образца уровня частоты мутаций, объединенных для мест проведения исследования.

Компонентные расчетные значения дисперсии для индивидуализованных мутантных образцов и образцов уровня частоты мутаций (подлежащая оценке выборка анализа на частоту мутаций)

Уровень мутации	Экзон	Замена аминокислоты	Замена основания	N	Средняя частота мутации	SD для места проведения исследования (% KB)	Оператор (сайт) SD (% KB)	День (место проведения, анализник) SD (% KB)	SD повторности (% KB)	Итоговое SD (% KB)
Низкий	KRAS экзон 2	p.Gly12Cys	c.34G>T	36	0,080	0,003 (4,0)	0,003 (4,0)	0,000 (0,0)	0,009 (10,8)	0,010 (12,2)
		p.Gly12Arg	c.34G>C	36	0,078	0,020 (25,2)	0,004 (5,3)	0,005 (6,6)	0,008 (9,8)	0,022 (28,3)
		p.Gly12Ser	c.34G>A	35	0,080	0,005 (6,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (13,9)	0,012 (15,2)
		p.Gly12Ala	c.35G>C	35	0,072	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (13,8)	0,013 (17,5)	0,016 (22,2)
		p.Gly12Asp	c.35G>A	36	0,072	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,002 (3,4)	0,013 (18,7)	0,014 (19,0)
		p.Gly12Val	c.35G>T	36	0,083	0,002 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (11,1)	0,010 (11,5)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	35	0,092	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,015 (16,7)	0,017 (18,9)	0,023 (25,3)
	KRAS экзон 3	p.Gln61His	c.183A>C	33	0,086	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (12,9)	0,011 (12,9)
	KRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	33	0,090	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,003 (3,1)	0,010 (10,7)	0,010 (11,2)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	0,099	0,005 (4,8)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,4)	0,010 (10,6)
	NRAS экзон 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	31	0,078	0,002 (2,9)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (12,1)	0,010 (12,4)
	NRAS экзон 3	p.Gln61Arg	c.182A>G	33	0,097	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,002 (1,8)	0,009 (9,5)	0,009 (9,6)
	NRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	35	0,086	0,001 (1,7)	0,002 (2,4)	0,003 (3,9)	0,007 (8,4)	0,008 (9,7)

Уровень мутации	Экзон	Замена аминокислоты	Замена основания	N	Средняя частота мутации	SD для места проведения исследования (% KB)	Оператор (сайт) SD (% KB)	День (место проведения, аналитик) SD (% KB)	SD повторности (% KB)	Итоговое SD (% KB)
Высокий	KRAS экзон 2	p.Ala146Thr	c.436G>A	35	0,080	0,006 (6,9)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (20,5)	0,017 (21,7)
		p.Gly12Arg	c.34G>C	33	0,230	0,047 (20,4)	0,004 (1,7)	0,000 (0,0)	0,019 (8,1)	0,051 (22,1)
		p.Gly12Ala	c.35G>C	36	0,281	0,009 (3,3)	0,000 (0,0)	0,008 (2,9)	0,013 (4,7)	0,018 (6,5)
Высокий	KRAS экзон 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	36	0,259	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (2,0)	0,015 (5,8)	0,016 (6,2)
		p.Gly12Val	c.35G>T	35	0,206	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,020 (9,9)	0,020 (9,9)
		p.Gly13Asp	c.38G>A	36	0,263	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (9,3)	0,024 (9,3)
		p.Gln61His	c.183A>C	35	0,259	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (5,0)	0,013 (5,0)
	KRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351A>T	36	0,267	0,008 (3,0)	0,007 (2,6)	0,003 (1,2)	0,014 (5,3)	0,018 (6,7)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	35	0,277	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,015 (5,6)	0,015 (5,6)
	NRAS экзон 2	p.Gly12Asp	c.35G>A	34	0,274	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (4,8)	0,013 (4,8)
		p.Gln61Arg	c.182A>G	34	0,281	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,012 (4,3)	0,012 (4,3)
	NRAS экзон 4	p.Lys117Asn	c.351G>T	36	0,258	0,010 (3,9)	0,010 (3,7)	0,012 (4,5)	0,045 (17,3)	0,048 (18,7)
		p.Ala146Thr	c.436G>A	36	0,258	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (5,6)	0,014 (5,6)

Аналитическая специфичность (интерферирующие вещества)

Исследование влияния интерферирующих веществ было проведено для оценки влияния потенциальных интерферирующих веществ на выполнение анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Оценку проводили в присутствии экзогенных веществ (парафинового воска, ксилола, этанола и протеиназы К, растворов для выделения), а также эндогенных веществ (некротической ткани и гемоглобина).

Экзогенные вещества

Исследуемые экзогенные вещества представляют собой растворы для выделения, обычно используемые в процессе выделения ДНК, перечень которых вместе с исследуемыми количествами приведен в таблице 24. Было протестировано пятнадцать (15) FFPE образцов колоректального рака на одно интерферирующее вещество и проведено сравнение с контрольными образцами, не подвергавшимися воздействию. Эти образцы представляли собой образцы дикого типа, не содержащие мутаций из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel (5/15 образцов), а также образцы, содержащие распространенные мутации из этого перечня (10/15 образцов). Максимальный уровень мультиплексирования для секвенируемых образцов соответствовал 10 исследуемым образцам вместе с контрольными образцами на один прогон.

Таблица 24 Исследуемые вещества

Интерферирующее вещество	Фактическое количество [мкл/25 мкл элюата]
Раствор для депарафинизации	$1,69 \times 10^{-04}$
Парафиновый воск (в ксилоле)	$2,50 \times 10^{-05}$
Ксилол	$2,50 \times 10^{-05}$
Этанол	$1,69 \times 10^{-04}$
Протеиназа К	$3,30 \times 10^{-06}$
Промывочный раствор, N	$6,25 \times 10^{-01}$
1-Кратный промывочный раствор, P	$6,25 \times 10^{-01}$
Промывочный буфер AW1	$6,25 \times 10^{-02}$
Промывочный буфер AW2	$6,25 \times 10^{-01}$

Для всех исследованных экзогенных веществ все 15 образцов соответствовали требованиям оценки контроля качества образцов (15/15, 100% прохождение прогона образцов контроля качества), и после приготовления библиотеки и секвенирования были получены действительные результаты (15/15, 100% успешное прохождение первого прогона).

ОРА, РРА и NPA рассчитывают для каждой мутации с учетом существующих 56 мутаций на один образец. Для всех 15 образцов для всех 9 экзогенных веществ было показано соответствие с контрольными условиями без воздействия во всех мутантных и немутантных положениях. Ложно положительных и ложно отрицательных результатов не наблюдали. Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при максимальных концентрациях, использование которых ожидается в процессе выделения геномной ДНК (гДНК) из FFPE ткани, не влияет на выполнение анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Эндогенные вещества (гемоглобин)

Было проведено тестирование каждого из пятнадцати (15) FFPE образцов CRC в присутствии или в отсутствие 2 мг/мл гемоглобина «высокой концентрации» в соответствии с определением Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI; Clinical and Laboratory Standards Institute). Эти образцы представляли собой образцы дикого типа, не содержащие мутаций из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel (5/15 образцов), а также образцы, содержащие распространенные мутации из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel (10/15 образцов). Максимальный уровень мультиплексирования для секвенируемых образцов соответствовал 10 исследуемым образцам вместе с контрольными образцами на один прогон. Все 15 образцов соответствовали требованиям оценки контроля качества образцов (15/15, 100% прохождение прогона образцов контроля качества), и после приготовления библиотеки и секвенирования были получены валидные результаты (15/15, 100% успешное прохождение первого прогона). Для всех 15 образцов было показано соответствие с контрольными условиями без воздействия во всех мутантных и немутантных положениях. Ложно

положительных или ложно отрицательных результатов не наблюдали. Исследованная концентрация гемоглобина не влияет на выполнение анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Некротическая ткань

Для оценки образцов эндогенной некротической ткани использовали пятнадцать (15) FFPE образцов CRC, в состав которых входили образцы дикого типа, не содержащие мутаций из перечня по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel (10/15 образцов), а также образцы, содержащие распространенные мутации из этого перечня (5/15 образцов), и 10–80% некротической ткани, определенной в ходе патологического исследования. Максимальный уровень мультиплексирования для секвенируемых образцов соответствовал 10 исследуемым образцам вместе с контрольными образцами на один прогон. Для 14/15 образцов были получены валидные результаты после приготовления библиотеки и секвенирования (93,3% первого успешного прогона образцов). Общий процент соответствия относительно метода секвенирования по Сэнгеру составлял 99,9% (783/784). PPA составлял 100% (4/4), а NPA оставал 99,9% (779/780). Один (1) выявленный ложно положительный результат, вероятно, был связан с тем, что частота мутации была ниже предела обнаружения для секвенирования по Сэнгеру. Таким образом, набор реагентов Praxis Extended RAS Panel соответствует характеристикам, если ткань содержит 10–80% некроза.

Исследования по определению интервала защиты

В исследованиях интервала защиты последовательности выполняемых действий в анализе с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel проводили оценку отдельных стадий: оценку качества образца, приготовления библиотеки и секвенирования. Для повышения степени разнообразия мутаций в исследуемые образцы включали геномную ДНК FFPE тканей и геномную ДНК линий клеток. Условия приготовления библиотеки исследовали при максимальном уровне мультиплексирования образцов, (10 образцов на один прогон).

Оценка качества образцов (стадия количественной ПЦР)

Пять образцов геномной ДНК исследовали при различных сроках хранения смеси для количественной ПЦР и реакционной смеси. Поскольку и смесь для количественной ПЦР и реакционную смесь используют сразу, условия тестирования включали выдерживание смеси для количественной ПЦР при комнатной температуре в течение 1 часа при обычном освещении, а реакционной смеси — в течение 10 минут на льду. Экспериментально определенные средние различия dCq менее 0,25 свидетельствуют о стабильности смеси для количественной ПЦР и реакционных смесей.

Приготовление библиотеки

Время и температуру инкубации гибридизации и удлинения-лигирования тестировали при приблизительно +/- 5% от указанного значения. Для 100% протестированных образцов был получен валидный результат с ожидаемыми мутациями.

Для удаления продукта удлинения-лигирования из фильтровального планшета в процессе ПЦР амплификации используют гидроксид натрия. Его концентрацию и время инкубации тестировали при приблизительно +/- 5% от указанного значения. Для 90% образцов, тестируемых при низкой концентрации гидроксида натрия, и для 100% образцов, тестируемых при всех остальных концентрациях, был получен валидный результат с ожидаемыми мутациями.

Время хранения рабочего раствора для ПЦР и время выдерживания планшета для ПЦР после амплификации тестировали при приблизительно +/- 5% от указанного значения. Для всех образцов, протестированных во всех вариантах условий, был получен валидный результат с ожидаемыми мутациями.

Для стадий очистки продукта ПЦР и нормализации библиотеки были протестированы следующие условия при приблизительно +/- 5% от указанного значения: а) время инкубации, б) время встряхивания и концентрации с) этанола (очистка продукта ПЦР), d) раствора гидроксида натрия (нормализация библиотеки). Для 90% образцов, тестируемых при более длительном времени элюирования на стадии очистки продукта ПЦР, и для 100% образцов, тестируемых при всех остальных условиях, был получен действительный результат с ожидаемыми мутациями.

Для стадии объединения библиотеки тестировали время термической денатурации и охлаждения при приблизительно +/- 5% от указанного значения. Для 90% образцов, тестируемых при более длительном охлаждении, и для 100% образцов, тестируемых при всех остальных условиях термической денатурации и охлаждения, был получен валидный результат с ожидаемыми мутациями.

Хранение разведенной библиотеки ампликонов (DAL; Diluted Amplicon Library) тестировали вплоть до 84 дней (в условиях хранения при -20 °C). Для 100% протестированных образцов был получен валидный результат с ожидаемыми мутациями.

Секвенирование

Надежность глубокого секвенирования достигается при соблюдении требования к минимальной глубине секвенирования для образцов, определенных как «валидные». Двумя (2) операторами было протестировано в общей сложности 40 образцов вместе с контрольными образцами для определения соответствия требованию к минимальному покрытию 1800X для обоих пулов (900x на один пул) на один образец при максимальном уровне мультиплексирования, включающем 10 образцов на один прогон. Все образцы соответствовали требованию к минимальному покрытию, составляющему приблизительно 31000x для обоих пулов на один образец.

Стабильность

Стабильность в режиме реального времени

Цель исследования стабильности в режиме реального времени состояла в установлении срока годности набора реагентов Praxis Extended RAS Panel путем оценки продукта на протяжении всего предлагаемого срока годности при хранении в условиях, указанных на этикетке. Дизайн исследования был основан на тестировании трех товарных партий набора реагентов Praxis Extended RAS Panel и на использовании классического дизайна исследования, описанного в CLSI EP25-A. В течение всего исследования наборы хранили в готовой конфигурации при условиях, указанных на этикетке продукта. Замораживаемые компоненты набора хранили при температуре от -15°C до -25°C . Охлаждаемые компоненты набора хранили при температуре от 2°C до 8°C . Компоненты, предназначенные для хранения при комнатной температуре, хранили при температуре от 15°C до 30°C . На этикетке каждого набора на коробке отпечатана соответствующая дата истечения срока годности.

Стабильность после вскрытия пробирки

Стабильность реагентов для оценки качества образцов и приготовления библиотеки в условиях применения после вскрытия пробирки оценивали при стандартных условиях применения. Ожидают, что эти реагенты будут использованы два (2) раза, что соответствует хранению компонентов, предназначенных для хранения при комнатной температуре и при температуре от 2°C до 8°C , в открытых пробирках и двум (2) циклам замораживания и оттаивания для реагентов, которые хранят при температуре от -15°C и -25°C . Замороженные реагенты подвергали 5 и 6 циклам замораживания и оттаивания между выполнением контрольного тестирования и окончательного тестирования. Компоненты, предназначенные для хранения при комнатной температуре и при температуре от 2°C до 8°C , тестировали в стандартных условиях применения в соответствии с требованиями, указанными на этикетке для двух отдельных препаратов библиотеки, после чего открытые реагенты закрывали и возвращали в указанные условия хранения между применениями. В исследовании показано, что для всех тестируемых наборов реагентов как при выполнении тестов, так и после циклов замораживания и оттаивания все критерии контроля качества выполнены.

Заключение по аналитическим исследованиям

При проведении оценки на уровне образца в других лабораториях исследования после исключения недействительных образцов Praxis показано, что у набора реагентов Praxis Extended RAS Panel PPA составляет 98,7% (227/230), а NPA — 97,6% (206/211) по сравнению с секвенированием по Сэнгеру.

С помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel можно определить 56 мутаций (таблица 1) в генах *KRAS* и *NRAS*. Выполнение анализа с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel показано для дельта C_q (ввода ДНК) в диапазоне от $-0,5$ до 5. ПО для каждой тестируемой мутации находился в диапазоне от 4,2% до 5,3%. Наличие интерферирующих веществ и некротической ткани не оказали отрицательного влияния на выполнение анализа. Ложно положительных мутаций в результате переноса образцов из одной лунки в другую или контаминации из одного прогона в другой не выявлено. Точность и воспроизводимость были показаны для многих источников, по которым может быть вариабельность при минимальном использовании партий реагентов и влияния других факторов на общую вариабельность.

Ссылки

- 1 Soric MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol*. 2015 Jan; 26(1): 13-21.
- 2 Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *J Mol Diagn* 2017; 19: 187-225.
- 3 Vaughn CP, Zobel SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 May; 50(5): 307-12.
- 4 US NCCN Guidelines: Colon Cancer V.1.2017.

Патенты и товарные знаки

Этот документ и его содержание являются собственностью компании «Иллюмина, Инк.» и ее дочерних компаний («Иллюмина») и предназначены для использования заказчиком исключительно на договорной основе в связи с применением описанного (ых) в настоящем документе изделия(й), а не для иных целей. Не допускается использование или распространение этого документа и его содержания в каких-либо иных целях и/или его передача, разглашение или воспроизведение содержания каким-либо иным путем без предварительного письменного согласия компании «Иллюмина». Данный документ не предусматривает передачу компанией «Иллюмина» каких-либо лицензий в соответствии с ее патентом, товарным знаком, авторскими правами или общими законодательными правами, а также аналогичных прав какой-либо третьей стороне.

Для правильного и безопасного использования описанного(ых) в настоящем документе изделия(й) квалифицированный и надлежащим образом подготовленный персонал обязан строго следовать инструкциям, представленным в данном документе. Перед использованием такого(их) изделия(й) необходимо полностью прочесть и понять все содержание данного документа.

НЕПОЛНОЕ ПРОЧТЕНИЕ И НЕ СОБЛЮДЕНИЕ ИНСТРУКЦИЙ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ(Й), ТРАВМИРОВАНИЮ ПЕРСОНАЛА, В ТОМ ЧИСЛЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ИЛИ ДРУГИХ ЛИЦ, И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИНОГО ИМУЩЕСТВА.

КОМПАНИЯ «ИЛЛЮМИНА» НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПИСАННОГО(ЫХ) В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ ИЗДЕЛИЯ(Й) (В ТОМ ЧИСЛЕ ЕГО СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ ИЛИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© 2017 Illumina, Inc. Все права защищены.

Illumina, Genetic Energy, MiSeqDx, Powered by Illumina, Praxis, TruSeq и поточный дизайн являются зарегистрированными или ожидающими регистрации товарными знаками компании «Иллюмина, Инк.» и/или ее дочерней(их) компании(й) в США и/или в других странах. Все остальные названия, логотипы и другие товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

Данное изделие можно использовать в качестве компонента медицинских молекулярно-диагностических анализов, если это разрешено применимым законодательством страны. Само изделие не обеспечивает какой-либо диагностический результат. Данное изделие включает в себя полимеразу GoTaq® Hot Start производства компании «Промега Корпорейшн» (Promega Corporation) для распространения компанией «Иллюмина, Инк.» по лицензии компании «Промега Корпорейшн» в соответствии с патентами США №№ 5,338,671 и 5,587,287 и их соответствующими иностранными патентами.



ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПОКУПАТЕЛЯ: ОГРАНИЧЕННОЕ ЛИЦЕНЗИРОВАНИЕ

За пределами США использование данного изделия осуществляется в соответствии с одним или более из следующих патентов США и соответствующих патентных формул: 5,994,056 и 6,171,785. Приобретение данного изделия включает ограниченный, не подлежащий передаче судебный иммунитет в соответствии с вышеуказанными патентными формулами на использование только данного количества изделия исключительно в области гарантии качества и контроля качества изделий и способов в области медицинской диагностики *in vitro*, включая без ограничений соблюдение спецификаций, чистоту и соответствие между сериями, а также включая отчеты о результатах деятельности покупателя в отношении оплаты услуг или других коммерческих вопросов. Передача прав в соответствии с какой-либо иной патентной формулой явным образом, посредством применения на практике или посредством лишения права возражения не допускается. Для получения дополнительной информации о приобретении лицензий обращайтесь на сайт outlicensing@lifetech.com или по адресу: отдел предоставления лицензий, «Лайф Текнолоджиз» (Life Technologies), 5791 Ван-Аллен-Вэй, г. Карлсбад, штат Калифорния 92008, США.

Контактная информация



«Иллюмина»

(Illumina)

5200 Иллюмина-Вэй

(5200 Illumina Way)

Г. Сан-Диего, штат Калифорния 92122 США

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (за пределами Северной Америки)

techsupport@illumina.com



Российская Федерация

Город Москва.

Шестнадцатого июня две тысячи двадцатого года.

Я, Дейнеко Людмила Валериевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Прокошенковой Елены Евгеньевны, свидетельствую подлинность подписи переводчика Лебедева Андрея Николаевича.

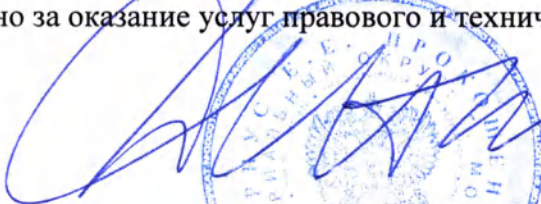
Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

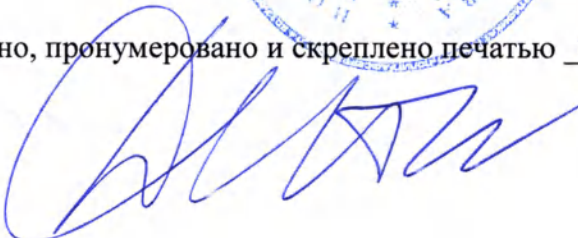
Зарегистрировано в реестре: № 21/86-н/77-2020- 14-2669

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 300 руб. 00 коп.


Л.В. Дейнеко

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 76 лист(-а,-ов).


Л.В. Дейнеко



Reagent kit Praxis™ Extended RAS Panel for qualitative determination of the status of specific mutations genes of RAS (KRAS (exons 2, 3, and 4) and NRAS (exons 2, 3, and 4) by sequencing a new generation in a human genomic DNA sample isolated from colorectal cancer tissue samples fixed in formalin and enclosed in paraffin blocks

Workflow Guide for Local Run Manager Praxis™ Extended RAS Panel Analysis Module

Manufacturer:

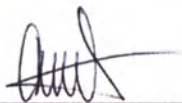
Illumina, Inc

Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA

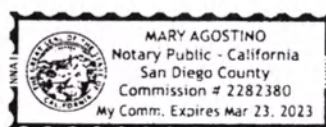
Approved

On behalf of Illumina, Inc.



Aurelia Brownridge
Sr. Regulatory Affairs Specialist
Illumina, Inc.

Date May 14, 2020



ACKNOWLEDGMENT

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California
County of San Diego)

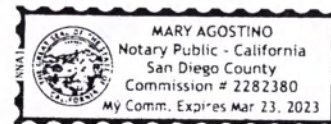
On May 14 2020 before me, Mary Agostino, Notary Public
(insert name and title of the officer)

personally appeared Aurelia Brownridge,
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are
subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in
his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the
person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing
paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Mary Agostino (Seal)



Local Run Manager Praxis Extended RAS Panel Analysis Module Workflow Guide

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Overview	3
Set Parameters	3
View Analysis Results	4
Analysis Report	4
Analysis Output Files	5
Technical Assistance	6



This document and its contents are proprietary to Illumina, Inc. and its affiliates ("Illumina"), and are intended solely for the contractual use of its customer in connection with the use of the product(s) described herein and for no other purpose. This document and its contents shall not be used or distributed for any other purpose and/or otherwise communicated, disclosed, or reproduced in any way whatsoever without the prior written consent of Illumina. Illumina does not convey any license under its patent, trademark, copyright, or common-law rights nor similar rights of any third parties by this document.

The instructions in this document must be strictly and explicitly followed by qualified and properly trained personnel in order to ensure the proper and safe use of the product(s) described herein. All of the contents of this document must be fully read and understood prior to using such product(s).

FAILURE TO COMPLETELY READ AND EXPLICITLY FOLLOW ALL OF THE INSTRUCTIONS CONTAINED HEREIN MAY RESULT IN DAMAGE TO THE PRODUCT(S), INJURY TO PERSONS, INCLUDING TO USERS OR OTHERS, AND DAMAGE TO OTHER PROPERTY.

ILLUMINA DOES NOT ASSUME ANY LIABILITY ARISING OUT OF THE IMPROPER USE OF THE PRODUCT(S) DESCRIBED HEREIN (INCLUDING PARTS THEREOF OR SOFTWARE).

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, Praxis, and the streaming bases design are registered or pending trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

Overview

The Local Run Manager Praxis™ Extended RAS Panel analysis module is for use with Praxis Extended RAS Panel. The analysis module performs secondary analysis and report generation from sequencing runs that use the Praxis Extended RAS Panel. See the package insert *Praxis Extended RAS Panel* (document # 1000000037190).

About This Guide

This guide provides instructions for setting up run parameters for sequencing and analysis for the Praxis Extended RAS Panel analysis module. For information about the Local Run Manager dashboard and system settings, see the *Local Run Manager Software Reference Guide* (document # 1000000011880).

Setting up a Run

- 1 Log in to Local Run Manager.
- 2 Click **Create Run**, and select **Extended RAS**.
- 3 Make sure that "Create Run Praxis Extended RAS" is visible in the top left corner of the screen.
- 4 Enter a run name that identifies the run from sequencing through analysis.
Use alphanumeric characters, spaces, underscores, or dashes.
- 5 [Optional] Enter a run description to help identify the run.
Use alphanumeric characters.

Specify Samples for the Run

Specify samples for the run using the following options:

- **Enter samples manually**—Use the table on the Create Run screen.
- **Import samples**—Navigate to an external file in a comma-separated values (*.csv) format.

After you have populated the samples table, you can export the sample information to an external file, and import the file for another run.

Enter Samples Manually

- 1 Click the plate region A1 or E7 to enter sample information in the samples table.
Region A1 is equivalent to the upper left quadrant of wells in the Hyb plate layout, and includes samples for Oligo Pools A and B.
Region E7 is equivalent to the lower right quadrant of wells in the Hyb plate layout, and includes samples for Oligo Pools A and B.
- 2 In the Pool A table, enter a unique sample name in the Sample Name field for each well you use.
Use alphanumeric characters, dashes, or underscores.
The sample name automatically populates the corresponding well in the Pool B table.
Dual index adapters for each Index Read, specific to the well, display as you enter a sample name.
- 3 [Optional] Although the default layout is recommended, to change the position of control samples, use the Positive Control or Negative Control drop down menu.
- 4 Click the print  icon to display the plate layout.

- 5 Select **Print** to print the plate layout as a reference for preparing libraries.
- 6 Click **Close**.
- 7 Click **Save Run**.

Import Samples

- 1 Click the plate region A1 or E7.
- 2 Click the **Export**  icon for an example template.
- 3 Enter a unique sample name in the template for up to 10 samples and save the file. Use alphanumeric characters, dashes, or underscores.

[Data] Sample Names as a 4 * 3 matrix		
Sample1	Sample5	Sample9
Sample2	Sample6	Sample10
Sample3	Sample7	Positive_Control
Sample4	Sample8	Negative_Control

- 4 Click **Import Samples**.
- 5 Browse to the location of the sample information file in *.csv file format.
- 6 When finished, click the print  icon to display the plate layout.
- 7 Select **Print** to print the plate layout as a reference for preparing libraries.
- 8 Click **Close**.
- 9 Click **Save Run**.

View Analysis Results

- 1 From the Local Run Manager dashboard, click the run name.
- 2 Click the **Samples and Results** tab to view the analysis report.
 - If analysis was repeated, expand the **Select Analysis** drop-down list and select the appropriate analysis.
- 3 [Optional] Click the **Copy to Clipboard**  icon to copy the Analysis folder path.

Analysis Report

Praxis Extended RAS Panel Report

The Praxis Extended RAS Panel Report details if a run passed or failed, and whether each sample contains any of the 56 Extended RAS Panel mutations.

The Run State on the **Samples and Results** tab shows if the sequencing run passed quality metrics. If the Run State is Fail, all samples are listed as invalid.

Sample Results

Table 1 Sample Results Table

Column Heading	Description
Sample Name	The sample name provided when the run was created.
Sample	Sample validity results. Valid – Presence or absence of panel mutations is reported. Invalid – Presence or absence of panel mutations cannot be determined. See <i>Sample Invalid</i> on page 5.
Result	Sample results for panel mutation detection. See <i>Panel Mutation Detected</i> on page 5 and <i>Panel Mutation Not Detected</i> on page 5.
Gene	The gene, <i>KRAS</i> or <i>NRAS</i> , where a mutation is detected, if applicable.
Exon	The exon number in which the mutation is present, if applicable.
Amino Acid	Human Genome Variation Society (HGVS) amino acid change notation.
Nucleotide	HGVS nucleotide change notation.

Sample Invalid

The sample result, **Invalid**, indicates that the presence or absence of a Praxis Extended RAS Panel mutation cannot be determined. Repeat library preparation, sequencing, and analysis for **Invalid** samples. If a sample fails 2 times, additional troubleshooting can be necessary. If all samples in a run are **Invalid** because of a Run State of Fail, contact Illumina Technical Support.

Panel Mutation Detected

The sample result, **Panel Mutation Detected**, indicates that a Praxis Extended RAS Panel mutation is detected. The report lists all detected mutations.

Panel Mutation Not Detected

The sample result, **Panel Mutation Not Detected**, indicates that no Praxis Extended RAS Panel mutations are detected.

Analysis Output

The following analysis output file is generated for the Praxis Extended RAS Panel analysis module. Analysis output files are located in the Alignment folder.

File Name	Description
ExtendedRasPanelReport.txt	The Praxis Extended RAS Panel report details if a run passed or failed, and whether each sample contains any of the 56 Extended RAS Panel mutations.

Alignment Folders

Each time that analysis is requested, the Local Run Manager creates an Alignment folder in the run folder named **Alignment_N**, where N is a sequential number.

Technical Assistance

For technical assistance, contact Illumina Technical Support.

Website: www.illumina.com
Email: techsupport@illumina.com

Illumina Customer Support Telephone Numbers

Region	Toll Free	Regional
North America	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Austria	+43 800006249	+43 19286540
Belgium	+32 80077160	+32 34002973
China	400.635.9898	
Denmark	+45 80820183	+45 89871156
Finland	+358 800918363	+358 974790110
France	+33 805102193	+33 170770446
Germany	+49 8001014940	+49 8938035677
Hong Kong	800960230	
Ireland	+353 1800936608	+353 016950506
Italy	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Netherlands	+31 8000222493	+31 207132960
New Zealand	0800.451.650	
Norway	+47 800 16836	+47 21939693
Singapore	+1.800.579.2745	
Spain	+34 911899417	+34 800300143
Sweden	+46 850619671	+46 200883979
Switzerland	+41 565800000	+41 800200442
Taiwan	00806651752	
United Kingdom	+44 8000126019	+44 2073057197
Other countries	+44.1799.534000	

Safety data sheets (SDSs)—Available on the Illumina website at support.illumina.com/sds.html.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (outside North America)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.



illumina®



**Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для
качественного определения статуса специфических мутаций
генов RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2, 3 и 4)
методом секвенирования нового поколения в пробе геномной
ДНК человека, выделенной из образцов тканей
колоректального рака, фиксированных в формалине, и
заключенных в парафиновые блоки**

**Руководство справочное для программного обеспечения Local Run
Manager для модуля анализа Praxis™ Extended RAS Panel**

Производитель:

«Иллюмина, Инк.»
(Illumina, Inc.)

Адрес:

5200 Иллюмина Уэй, Сан-Диего, Калифорния 92122, США
(5200 Illumina Way, San Diego, California 921221, USA)

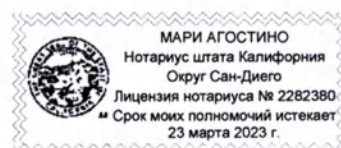
Утверждено

Со стороны Иллюмина, Инк.

/подпись/

Аурелия Браунридж
Главный специалист нормативно-правового отдела
Illumina, Inc.

Дата: 14 мая 2020 г



НОТАРИАЛЬНОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

Государственный нотариус или другое должностное лицо, заполняющее настоящий сертификат, подтверждает только личность физического лица, подписавшего документ, к которому приложен настоящий сертификат, но не отвечает за достоверность, точность или действительность такого документа.

Штат Калифорния

Округ Сан-Диего)

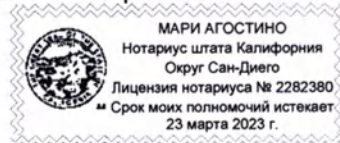
14 мая 2020 г. в моем присутствии, Мари Агостино, нотариуса
(вставить ФИО и должность должностного лица)

Аурелиа Браунридж лично

подтвердила на основании убедительных доказательств, что она является лицом, чьим именем подписан документ, и заверила меня, что она подписала его в силу имеющихся у нее полномочий, а также, что проставлением ее подписи на документе физическое или юридическое лицо, от имени которого лицо действовало, исполнило данный документ.

ОСОЗНАВАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ, в соответствии с законодательством Штата Калифорния, я подтверждаю, что вышеизложенная информация является верной.

УДОСТОВЕРЯЮ СОБСТВЕННОРУЧНОЙ ПОДПИСЬЮ И ОФИЦИАЛЬНОЙ ПЕЧАТЬЮ.



Подпись _____ /подпись/ _____ (Печать)

Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis Extended RAS Panel

для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Общая информация	3
Установка параметров	3
Отчет об анализе	4
Выходные файлы после анализа	5
Техническая поддержка	6



Документ № 1000000011875 v00

Июль 2017 г.

для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

ЧАСТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
КОМПАНИИ ILLUMINA

Настоящий документ является собственностью компании Illumina, Inc. и ее аффилированных лиц, и предназначен исключительно для использования заказчиком компании согласно договору и совместно с использованием других продуктов/изделий, которые описаны в настоящем документе. Распространение или передача настоящего документа и его информации любым способом для любых других целей без письменного согласия компании Illumina запрещены. Настоящим документом компания Illumina не передает никаких лицензий на результаты своей работы, защищенные патентами, торговыми марками и авторскими правами или в соответствии с нормами общего права или подобными правами третьих лиц.

Для правильного и безопасного использования описанных изделий, указанные инструкции должны строго выполняться квалифицированным и специально обученным персоналом. Перед использованием таких изделий обязательно следует ознакомиться со всей информацией, представленной в настоящем документе. НЕПОЛНОЕ ОЗНАКОМЛЕНИЕ С ИНФОРМАЦИЕЙ И НЕТОЧНОЕ СОБЛЮДЕНИЕ ВСЕХ УКАЗАННЫХ ИНСТРУКЦИЙ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЙ/ПРОДУКТОВ, ТРАВМИРОВАНИЮ ПЕРСОНАЛА, В ТОМ ЧИСЛЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ И ДРУГИХ ЛИЦ, А ТАКЖЕ К НАНЕСЕНИЮ УЩЕРБА ИМУЩЕСТВУ.

КОМПАНИЯ ILLUMINA НЕ ПРИНИМАЕТ НА СЕБЯ НИКАКОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПИСАННЫХ ИЗДЕЛИЙ/ПРОДУКТОВ, ИХ КОМПОНЕНТОВ ИЛИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ.

Авторское право © 2017 Компания Illumina, Inc. Все права защищены.

Illumina, Praxis и дизайн со струящимися символами являются зарегистрированными или ожидающими регистрации торговыми наименованиями компании Illumina, Inc. и/или ее аффилированных лиц в США и других странах. Все остальные наименования, логотипы и прочие торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

Общая информация

Программное обеспечение Local Run Manager, модуль анализа данных Praxis™ Extended RAS Panel используется совместно с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel. Данный модуль выполняет вторичный анализ и формирование отчетов по результатам секвенирования, которые выполняются с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. См. инструкцию по применению на «Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel» (документ № 1000000037190).

О данной инструкции

В данной инструкции приведены указания по настройке параметров рабочего цикла секвенирования и анализа для программного модуля анализа данных полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Описание панели инструментов и системных настроек приложения Local Run Manager см. в справочном руководстве к ПО Local Run Manager (документ № 1000000011880).

Установка параметров

- 1 Зайдите в программу Local Run Manager.
- 2 Щелкните «Создать рабочий цикл» (Create Run) и выберите **Extended RAS**.
- 3 Убедитесь, что в левом верхнем углу экрана отображается «Create Run Praxis Extended RAS» (создание цикла Praxis Extended RAS).
- 4 Введите название рабочего цикла для идентификации всего процесса анализа, начиная с секвенирования.
Используйте буквенно-цифровые символы, пробелы, знаки подчеркивания или дефисы.
- 5 [Опционально] Введите описание рабочего цикла, чтобы сделать его поиск легче.
Используйте буквенно-цифровые символы.

Указание образцов для цикла

Укажите образцы для рабочего цикла с помощью следующих опций:

- ▶ **Ручной ввод образцов (Enter samples manually)** – используйте таблицу на экране Create Run (Создать рабочий цикл).
- ▶ **Импорт образцов (Import samples)** – выберите файл в формате значений с разделителями-запятыми (*.csv).

После заполнения таблицы образцов можно экспортировать данные образцов во внешний файл и, впоследствии, импортировать его при проведении другого рабочего цикла/анализа.

Ручной ввод образцов

- 1 Щелкните на области планшета A1 или E7 для ввода данных образца в таблицу. Область A1 соответствует верхнему левому квадранту лунок на схеме планшета Hyb и включает образцы для пулов праймеров A и B (Oligo A и B). Область E7 соответствует нижнему правому квадранту лунок на схеме планшета Hyb и включает образцы для пулов праймеров A и B (Oligo A и B).
- 2 В таблице «Пул А» в поле наименования образца (Sample Name) введите уникальное наименование образца для каждой используемой лунки. Используйте буквенно-цифровые символы, дефисы или знаки подчеркивания. Название образца автоматически вносится в соответствующую лунку в таблице «Пул В». При вводе названия образца каждой считываемой позиции присваивается двухзначный индекс.
- 3 [Опционально] Несмотря на то, что рекомендуется использовать схему размещения по умолчанию, изменить расположение контрольных образцов можно с помощью выпадающего меню Positive Control (Положительный контроль) или Negative Control (Отрицательный контроль).
- 4 Щелкните по значку «Печать» (Print)  для отображения схемы планшета.

- 5 Нажмите **«Печать» (Print)**, чтобы распечатать схему размещения образцов на планшете для подготовки библиотек.
- 6 Щелкните **«Заккрыть» (Close)**.
- 7 Щелкните **«Сохранить рабочий цикл» (Save Run)**.

Импорт образцов

- 1 Щелкните по области планшета A1 или E7.
- 2 Щелкните по значку экспорта **Export**  для отображения примерного шаблона.
- 3 Введите уникальные названия образцов в количестве до 10 шт. и сохраните файл. Используйте буквенно-цифровые символы, дефисы или знаки подчеркивания.

[Data] [Данные]	Sample Names as a 4 * 3 (matrix) (Названия образцов в формате матрицы 4 * 3)	
Sample1 (Образец1)	Sample5 (Образец5)	Sample9 (Образец9)
Sample2 (Образец2)	Sample6 (Образец6)	Sample10 (Образец10)
Sample3 (Образец3)	Sample7 (Образец7)	Positive_Control (Положительный контроль)
Sample4 (Образец4)	Sample8 (Образец8)	Negative_Control (Отрицательный контроль)

- 4 Щелкните **«Импорт образцов» (Import Samples)**.
- 5 Укажите расположение файла информации об образцах в формате *.csv.
- 6 Далее щелкните на значке «Печать» (Print)  для отображения схемы планшета.
- 7 Нажмите **«Печать» (Print)**, чтобы распечатать схему размещения образцов на планшете в качестве образца для подготовки библиотек.
- 8 Щелкните **«Заккрыть» (Close)**.
- 9 Щелкните **«Сохранить прогон» (Save Run)**.

Просмотр результатов анализа

- 1 На панели инструментов приложения Local Run Manager выберите название рабочего цикла.
- 2 Выберите таблицу «Образцы и результаты» (Samples and Results), чтобы просмотреть отчет об анализе.
 - Если анализ выполнялся повторно, раскройте список выбора анализов (Select Analysis) и выберите нужный анализ.
- 3 [Опционально] Щелкните по значку **«Копировать в буфер обмена» (Copy to Clipboard)** , чтобы скопировать путь к папке с файлом данных анализа.

Отчет об анализе

Отчет по анализу данных, полученных с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel

В отчете по анализу данных, полученных с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel содержится информация об успешном или неудачном завершении прогона и о нахождении в образцах какой-либо из 56 мутаций, которые анализируются с применением набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Статус рабочего цикла (Run State) во вкладке «Образцы и результаты» (Samples and Results) показывает соответствие рабочего цикла секвенирования показателям качества. Если статус рабочего цикла «Ошибка» (Fail), для всех образцов устанавливается состояние «не действителен» (invalid).

Результаты по образцам

Таблица 1 Результаты по образцам

Заголовок столбца	Описание
Sample name (Название образца)	Название образца, указанное при создании рабочего цикла.
Sample (Образец)	Результаты проверки валидности образцов. Действительный. (Valid) – информация о наличии/отсутствии мутаций предоставляется. Не действительный. (Invalid) – наличие/отсутствие мутаций определить невозможно. См. раздел <i>Недействительный образец на странице 5</i> .
Result (Результат)	Результаты обнаружения мутаций в образцах. См. разделы <i>Мутация обнаружена на странице 5</i> и <i>Мутация не обнаружена на странице 5</i> .
Gene (Ген)	Ген KRAS или NRAS, в котором обнаружена мутация, если применимо.
Exon (Экзон)	Номер экзона, в котором имеется мутация, если применимо.
Amino Acid (Аминокислота)	Примечание об изменении аминокислоты по данным HGVS (Human Genome Variation Society).
Nucleotide (Нуклеотид)	Примечание изменений нуклеотидов согласно HGVS.

Недействительный образец

Результат «Недействительный образец» (Invalid) указывает на то, что определить наличие или отсутствие мутации гена с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel невозможно. Для таких образцов необходимо повторно выполнить подготовку библиотеки, секвенирование и анализ. Если повторный анализ образца также завершается с ошибкой, может потребоваться дополнительное устранение проблем. Если все образцы в цикле недействительны, т. к. статус цикла «Ошибка», обратитесь в службу техподдержки компании Illumina.

Мутация обнаружена

Результат «Мутация обнаружена» (Panel Mutation Detected) указывает на то, что с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel была обнаружена мутация гена. В отчете будет приведена вся информация по обнаруженным мутациям.

Мутация не обнаружена

Результат «Мутация не обнаружена» (Panel Mutation Not Detected) указывает на то, что с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel мутации гена не обнаружены.

Выходные файлы после анализа

Для модуля анализа данных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel формируется следующий выходной файл после анализа данных. Выходные файлы после анализа находятся в папках Alignment.

Имя файла	Описание
ExtendedRasPanelReport.txt	В отчете содержится информация об успешном или неудачном завершении цикла анализа и о нахождении в образцах какой-либо из 56 мутаций исследуемых с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Папки Alignment

При каждом повторном добавлении анализа в очередь приложение Local Run Manager создает папку Alignment в папке цикла с именем **Alignment_N**, где N – порядковый номер.

Техническая поддержка

По всем техническим вопросам обращайтесь в службу тех-поддержки компании Illumina.

Веб-сайт: www.illumina.com
Эл. почта: techsupport@illumina.com

Номера телефонов службы тех-поддержки компании Illumina

Регион	Бесплатный номер	Региональная поддержка
Северная Америка	+ 1 800 809 4566	
Австралия	+ 1 800 775 688	
Австрия	+43 800006249	+43 19286540
Бельгия	+32 80077160	+32 34002973
Китай	400 635 9898	
Дания	+45 80820183	+45 89871156
Финляндия	+358 800918363	+358 974790110
Франция	+33 805102193	+33170770446
Германия	+49 8001014940	+49 8938035677
Гонконг	800960230	
Ирландия	+3531800936608	+353016950506
Италия	+39 800985513	+39 236003759
Япония	0800 111 5011	
Нидерланды	+31 8000222493	+31 207132960
Новая Зеландия	0800 451 650	
Норвегия	+47 800 16836	+47 21939693
Сингапур	+ 1.800.579 2745	
Испания	+34 911899417	+34 800300143
Швеция	+46 850619671	+46 200883979
Швейцария	+41 565800000	+41 800200442
Тайвань	00806651752	
Великобритания	+44 8000126019	+44 2073057197
Другие страны	+44 1799 534000	

Паспорта безопасности материалов (SDS) доступны на веб-сайте компании Illumina support.illumina.com/sds.html.



Компания Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 США.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (за пределами Северной Америки)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



illumina

Российская Федерация

Город Москва.

Шестнадцатого июня две тысячи двадцатого года.

Я, Дейнеко Людмила Валериевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Прокошенковой Елены Евгеньевны, свидетельствую подлинность подписи переводчика Лебедева Андрея Николаевича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 21/86-н/77-2020- *М. 2640*

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 300 руб. 00 коп.

[Подпись]
Л.В. Дейнеко

Пронумеровано, пронумеровано и скреплено печатью 15 лист(-а,-ов).

[Подпись]
Л.В. Дейнеко

Reagent kit Praxis™ Extended RAS Panel for qualitative determination of the status of specific mutations genes of RAS (*KRAS* (exons 2, 3, and 4) and *NRAS* (exons 2, 3, and 4) by sequencing a new generation in a human genomic DNA sample isolated from colorectal cancer tissue samples fixed in formalin and enclosed in paraffin blocks

Addendum to instruction for use

Manufacturer:

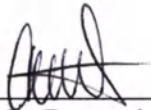
Illumina, Inc

Address:

5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA

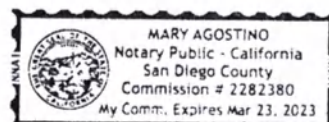
Approved

On behalf of Illumina, Inc.



Aurelia Brownridge
Sr. Regulatory Affairs Specialist
Illumina, Inc.

Date June 16, 2020



ACKNOWLEDGMENT

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California
County of San Diego

On June 16, 2020 before me, Mary Agostino, Notary Public
(insert name and title of the officer)

personally appeared Angelina Brownridge
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Mary Agostino (Seal)



1. Наименование медицинского изделия.**Наименование изделия:**

Набор реагентов PraxisTM Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (далее Praxis Extended RAS Panel или набор реагентов Praxis Extended RAS Panel) в составе:

I. Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 1:**Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 1A:**

- 1.1. Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer) – 1 пробирка (4,32 мл/пробирка).
- 1.2. Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix) – 1 пробирка (4,8 мл/пробирка).
- 1.3. Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) - H (A508)) – 1 пробирка для каждого праймера (192 мкл/пробирка).
- 1.4. Праймеры индексированные I (A701) – 12 (A712) (Index Primers I (A701) - 12 (A712)) - 1 пробирка для каждого праймера (128 мкл/пробирка).
- 1.5. ПЦП полимеразы (PCR Polymerase) – 1 пробирка (56 мкл/пробирка).
- 1.6. Смесь для ПЦП (PCR Master Mix) – 1 пробирка (2,8 мл/пробирка).

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 1B:

- 1.7. Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) – 1 пробирка (4,6 мл/пробирка).
- 1.8. Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) – 2 пробирки (4,5 мл/пробирка).
- 1.9. Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) – 1 пробирка (10 мкл/пробирка).

II. Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 2:

- 2.1. Картридж MiSeqTM Dx SBS v3 (MiSeqTM Dx SBS Cartridge v3) – 2 шт.

III. Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 3:**Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 3A:**

- 3.1. Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer) – 1 флакон (24 мл/флакон).
- 3.2. Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer) – 1 пробирка (4,8 мл/пробирка).

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 3B:

- 3.3. Микрочастицы для очистки ПЦП-продуктов (PCR Clean-Up Beads) – 1 пробирка (5 мл/пробирка).
- 3.4. Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash) – 2 пробирки (4,8 мл/пробирка).
- 3.5. Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) – 1 пробирка (1,2 мл/пробирка).
- 3.6. Ячейка проточная MiSeqTM Dx (MiSeqTM Dx Flow Cell) – 2 резервуара (1 ячейка на резервуар).

IV. Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 4:

- 4.1. Буфер MiSeqTM Dx SBS (PR2) (MiSeqTM Dx SBS Solution (PR2)) – 2 флакона (500 мл/флакон).

V. Реагенты для пре- и пост-амплификации, коробка 5:**Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 5:**

- 5.1. Планшет фильтровальный TruSeqTM Custom Amplicon Dx (TruSeqTM Custom Amplicon Dx Filter Plate) – 2 шт.

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 5:

- 5.2. Буфер для элюции (Elution Buffer) – 1 пробирка (4,8 мл/пробирка).
- 5.3. Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer) – 1 пробирка (3,5 мл/пробирка).

VI. Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 6:

- 6.1. Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) – 1 пробирка (150 мкл/пробирка).
- 6.2. Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) – 1 пробирка (150 мкл/пробирка).
- 6.3. Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers) – 4 пробирки (75 мкл/пробирка).
- 6.4. ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) – 1 пробирка (220 мкл/пробирка).
- 6.5. Смесь для количественной ПЦП (qPCR Master Mix) – 2 пробирки (1 мл/пробирка).

6.6. Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS) – 1 пробирка (8 мкл/пробирка).

VII. Инструкция по применению – 1 шт.

VIII. Руководство справочное – 1 шт.

XI. Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis™ Extended RAS Panel – 1 шт.

2. Назначение и принцип действия медицинского изделия

2.1 Назначение

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel представляет собой набор для качественного определения статуса 56 специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака (CRC), фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (FFPE) для диагностики *in vitro*. Этот набор предусмотрен для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx компании Иллюмина (Illumina).

3. Область применения и функциональное назначение

Клиническая лабораторная диагностика.

4. Тип исследуемого образца

Образец ДНК, выделенный из образцов тканей колоректального рака (CRC), фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (FFPE).

5. Вид анализа

Качественный.

6. Популяционные демографические аспекты использования медицинского диагностического изделия

Не применимо.

7. Сведения о потенциальных пользователях медицинского изделия

Специалисты, квалифицированные в области клинической лабораторной диагностики. Только для профессионального применения.

8. Показания и противопоказания к использованию медицинского изделия

8.1. Показания:

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel предназначен для качественного определения статуса 56 специфических мутаций в генах RAS [*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)] в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака (CRC), фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (FFPE).

Пациентам с колоректальным раком при отсутствии мутации в генах RAS показана противоопухолевая терапия моноклональными антителами к EGFR.

Показания	Биомаркеры	Лечение	Рекомендации по лечению
Колоректальный рак - с диким типом генов RAS	<i>KRAS</i> дикий тип (отсутствие мутаций в экзонах 2, 3 и 4) и <i>NRAS</i> дикий тип (отсутствие	Противоопухолевая терапия моноклональными антителами к EGFR	http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak_pryamoy_kishki_pr2018.pdf http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak_obodochnoy_kishki_pr2018.pdf

	мутаций в экзонах 2, 3 и 4)		
--	-----------------------------	--	--

8.2. Противопоказания

Известных противопоказаний нет.

8.3. Возможные побочные эффекты использования медицинского изделия

Не применимо.

9. Информация о производителе (изготовителе) и разработчике медицинского изделия и месте (местах) производства медицинского изделия

9.1. Информация о производителе (изготовителе) и разработчике медицинского изделия

«Иллюмина, Инк.», 5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (Illumina, Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

9.2. Информация о месте (местах) производства медицинского изделия

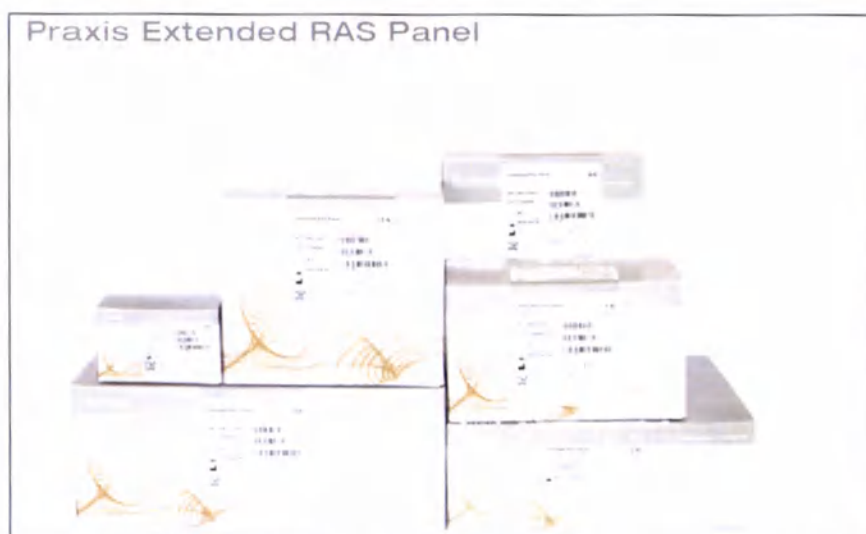
Иллюмина, Инк.», 5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (Illumina, Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

10. Класс потенциального риска медицинского изделия

Класс потенциального риска 2б.

11. Общее описание медицинского изделия и его компонентов (частей)

11.1. Внешний вид медицинского изделия



11.2. Общее описание медицинского изделия

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel предназначен для обнаружения специфичных мутаций в экзонах 2, 3 и 4 генов *KRAS* и *NRAS* на генетическом секвенаторе MiSeq, вариант исполнения: MiSeq Dx, компании «Иллюмина» (Illumina) MiSeqDx.

Протокол по набору реагентов Praxis Extended RAS Panel начинают с оценки качества образцов. Качество образцов выделенной ДНК оценивают посредством количественной ПЦР в реальном

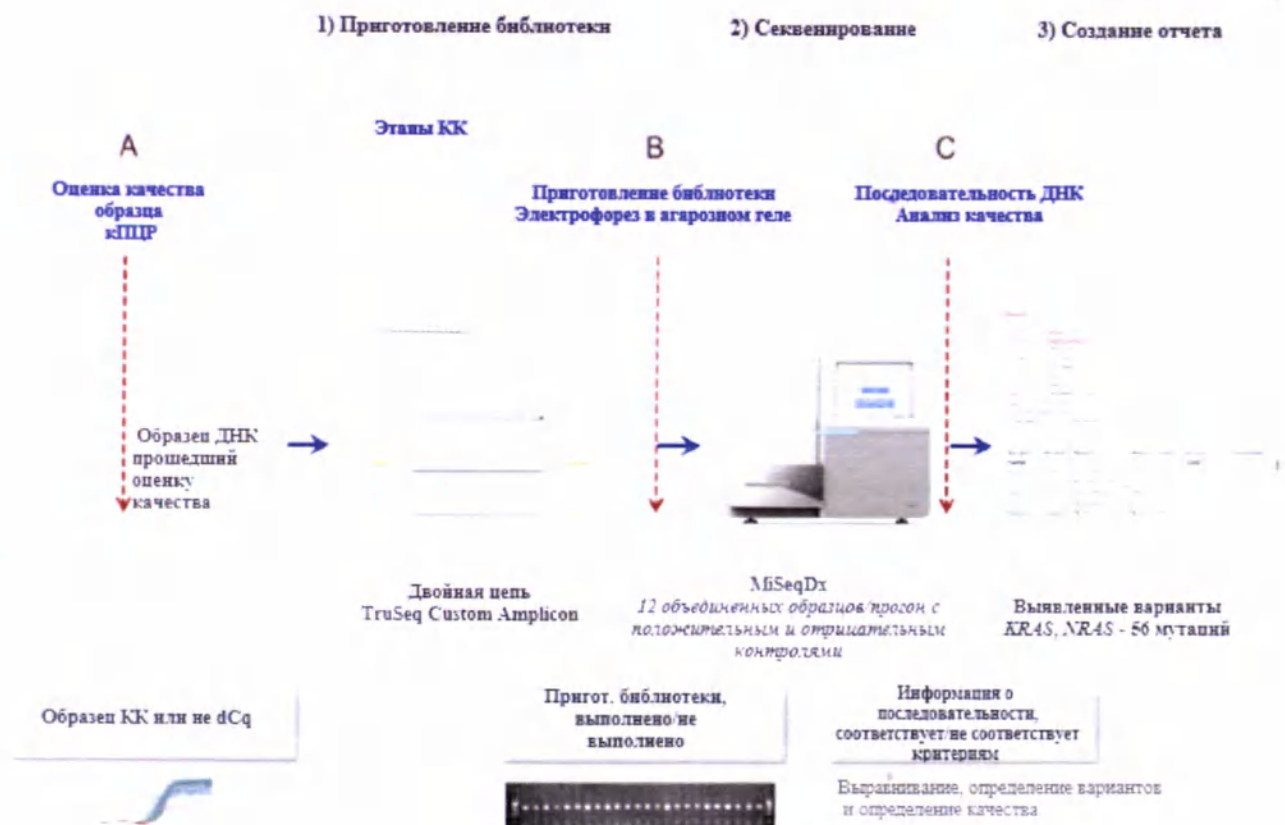
времени (кПЦР), которая позволяет определить качество и количество ДНК по результатам амплифицируемости ДНК. Образцы должны удовлетворять требованиям, указанным в сопроводительной информации к набору реагентов Praxis Extended RAS Panel. Для оценки образцов ДНК, лицензированных внешними поставщиками, в набор реагентов Praxis Extended RAS Panel входит смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix). Спецификации на амплификатор (термоциклер) для кПЦР, полученные при оценке трех коммерческих моделей амплификаторов, будут представлены в информации об изделии.

Образцы ДНК, удовлетворяющие требованиям, используют при приготовлении библиотеки для получения целевых специфических ампликонов. Для последующего разделения образцов в процессе анализа используют индексирование, что позволяет объединять образцы перед секвенированием. Объединенные образцы секвенируют на генетическом секвенаторе MiSeq, вариант исполнения: MiSeqDx, компании «Иллюмина» (Illumina).

Примечания: описание генетического секвенатора MiSeq, вариант исполнения: MiSeqDx приведено в инструкции по эксплуатации на прибор.

Схема использования набора реагентов Praxis Extended RAS Panel в общей диагностической системе показана на рисунке: RAS Panel System.

Рисунок: RAS Panel System



Методика анализа:

Проведение анализа с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel включает три процесса, описанных ниже:

Оценка качества образца:

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel применяют для анализа образцов ДНК, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки (FFPE). Поскольку размер образцов тканей и количество неопластических клеток значительно различаются, перед выделением ДНК образцы следует проверять. Рекомендовано использовать образцы тканей толщиной 5 мкм и совокупной площадью 240 мм² или более, с содержанием опухолевых тканей $\geq 50\%$. Для получения оптимального количества амплифицируемой ДНК рекомендовано использовать 8 срезов по 5 мкм или эквивалентное количество серийных срезов другой толщины. Более подробные рекомендации по выделению ДНК из образцов FFPE приведены в сопроводительной информации об изделии.

Работу с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel начинают с этапа определения качества ДНК, выделенной из образцов FFPE; качество ДНК оценивают по количеству амплифицируемой ДНК образца в сравнении с контрольной ДНК-матрицей. При оценке качества образцов определяют различия циклов количественного определения (дельта значений Cq) для каждого образца в сравнении с контрольной ДНК-матрицей. Для использования набора реагентов Praxis Extended RAS Panel значение дельта Cq для геномной ДНК образца должно быть $\leq 5,00$. Компания «Иллюмина» (Illumina)

не рекомендует проводить анализ образцов ДНК, для которых получено значения дельта Cq > 5,00, с использованием набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Проведение анализа кПЦР и критерии качества образцов приведены в сопроводительной информации об изделии.

Приготовление библиотеки:

Процесс приготовления библиотеки состоит из четырех основных стадий: гибридизация, элонгация-лигирование, ПЦР-амплификация и нормализация библиотеки.

После выделения ДНК и подтверждения качества образца начинают этап приготовления библиотеки с гибридизации геномной ДНК с предварительно смешанной оптимизированной смесью праймеров, специфичных к последовательностям, расположенным выше и ниже от целевой области Praxis Extended RAS Panel. Каждый зонд включает locus-специфичную последовательность и адаптерную последовательность, которые используются при последующей амплификации. Два пула праймеров (А и В) позволяют независимо тестировать каждую нить ДНК. По окончании этого процесса выполняют трехступенчатую процедуру отмывки с использованием фильтра, с помощью которого выборочно (в зависимости от размера) удаляются несвязавшиеся праймеры из раствора геномной ДНК.

На стадии элонгации-лигирования происходит соединение праймеров, расположенных выше и ниже по последовательности. ДНК-полимераза осуществляет достройку вдоль всей целевой области, начиная с праймеров, расположенных выше по последовательности, а затем ДНК-лигаза осуществляет лигирование с 5'-концом праймеров, расположенных ниже по последовательности. В результате образуются продукты, содержащие RAS-специфичные праймеры и фланкируемые ими последовательности, выбранные для амплификации.

Амплификацию продуктов элонгации-лигирования осуществляют при помощи универсальных праймеров, которые присоединяют индексные последовательности для мультиплексирования образцов, а также общие адаптеры, необходимые для образования кластеров в генетическом секвенаторе MiSeqDx. Эти праймеры включают специфические метки последовательностей, которые позволяют объединять образцы в одной ячейке проточной и/или в одном прогоне секвенирования в конце анализа. В праймеры также включены последовательности, комплементарные последовательностям нуклеотидов захвата, фиксированных на ячейке проточной. В результате образуются продукты, содержащие RAS специфичные олигонуклеотиды, фланкированные последовательностями, необходимыми для амплификации.

Наличие продуктов ПЦР оценивают методом электрофореза в геле. После очистки ПЦР-продуктов количество каждого варианта библиотеки нормализуют при помощи компонента с микрогранулами, обеспечивая равномерную представленность каждого варианта библиотеки в конечной объединенной образце. Объединенные библиотеки ампликонов могут без предварительной обработки непосредственно вводиться в картридж MiSeqDx SBS v3 (MiSeqDx SBS Cartridge v3) для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx.

Секвенирование:

После приготовления библиотеки и внесения объединенной библиотеки в картридж MiSeqDx SBS v3 (MiSeqDx SBS Cartridge v3) проводят следующий основной этап — секвенирование на генетическом секвенаторе MiSeqDx. Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel позволяет провести полное секвенирование 141 пары оснований в двух направлениях последовательности, обеспечивая секвенирование каждой целевой области каждого образца в двух направлениях с оптимальной точностью. Используется химический метод секвенирования путем синтеза (SBS), в котором четыре

нуклеотида с флуоресцентными метками параллельно включены в гибридизованные кластеры образцов на поверхности ячейки проточной. Нуклеотидная метка выполняет функцию терминатора полимеризации, поэтому после включения каждого dNTP флуоресцентный краситель визуализируется, что позволяет идентифицировать нуклеотид с последующим ферментативным расщеплением для включения следующего нуклеотида. Процесс повторяют для нужного числа циклов секвенирования.

Интерпретация результатов:

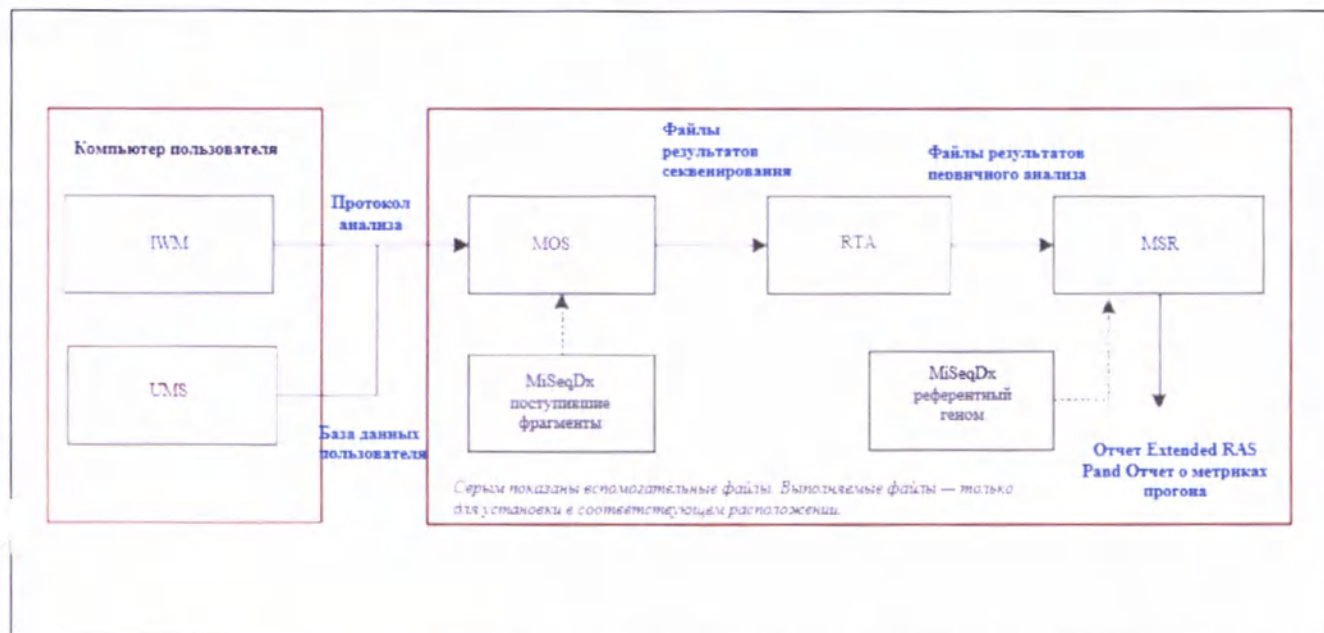
Для интерпретации результатов анализа данных, полученных с использованием набора реагентов Praxis Extended RAS Panel используют программное обеспечение Local Run Manager модуль анализа Praxis Extended RAS Panel.

Этот модуль предоставляет решения о проведении вторичного анализа и составляет отчет о прогонах секвенирования с использованием набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. См. инструкцию по применению набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Примечание: программное обеспечение Local Run Manager модуль анализа Praxis Extended RAS Panel, становится на генетическом секвенаторе MiSeq, вариант исполнения: MiSeq Dx.

Для проведения анализа с набором реагентов Praxis Extended RAS Panel используются различные приложения для ввода, обработки, сканирования, контроля качества и анализа данных на разных стадиях процесса на генетическом секвенаторе MiSeq, вариант исполнения: MiSeqDx. Алгоритм, позволяющий проводить вторичный анализ данных секвенирования, полученных системой, является частью приложения для составления отчетов MiSeq Reporter (MSR) и в дальнейшем в настоящем документе эта архитектура программного обеспечения (ПО) упоминается как ПО Extended RAS Panel с MSR. Программное обеспечение Praxis Extended RAS Panel с MSR использовалось для клинических исследований. Подробная информация о ПО Praxis Extended RAS Panel с MSR приведена на блок-схеме: программное обеспечение Praxis Extended RAS Panel с MSR.

Блок-схема: программное обеспечение Praxis Extended RAS Panel с MSR.



После первой разработки программного обеспечения для анализа данных, полученных с помощью набора реагентов Praxis Extended RAS Panel с MSR (MiSeq Reporter) была произведена оптимизация архитектуры программного обеспечения для платформы MiSeqDx с целью обеспечения возможностей его расширения для разработки других тестов (анализов, которые будут выполняться на приборе, а также связанных с ними реагентов и расходных материалов) и для обеспечения возможности непосредственной валидации этих тестов, что позволило продолжить разработку продукта в регламентированных условиях.

Целью оптимизации была разработка платформы, не зависящей от проводимых тестов, что создало бы более легкую интеграцию последующих тестов и единый согласованный пользовательский интерфейс. Кроме того, оптимизация повышает удобство работы пользователей за счет отказа от вспомогательных программ и консолидации их функционала.

Программное обеспечение для Praxis Extended RAS Panel с MSR использовали в аналитических и клинических исследованиях. Для демонстрации аналитической эквивалентности было проведено сравнительное исследование с использованием MSR и MiSeqDx Analysis Portal (MAP).

В этом исследовании оценивалась аналитическая эквивалентность данных, полученных с использованием Extended RAS Panel и текущей программной архитектуры с MSR, и программной архитектуры, которая будет выпущена вместе с этим продуктом — п/о Extended RAS Panel Software с MAP для коммерческой реализации. Сравнивали результаты циклов секвенирования с использованием одинаковых библиотек. Библиотеки подготовили из образцов тканей FFPE колоректального рака и образцов FFPE клеточных линий. Исследование проводили в два этапа:

- 1 этап — сравнение данных независимых циклов секвенирования одинаковых библиотек. Готовили библиотеки образца в двух идентичных повторностях, используя наборы образцов для оценки воспроизводимости анализа; циклы секвенирования проводили на двух разных приборах — с установленным п/о Extended RAS Panel с MSR и п/о Extended RAS Panel с MAP.

- 2 этап - Сравнение файлов VCF, созданных п/о MAP и MSR. Исходные данные, полученные с использованием п/о Extended RAS Panel с MSR на 1 этапе исследования, повторно анализировали с помощью п/о Extended RAS Panel с MAP. Для импорта исходных данных п/о Extended RAS Panel с MSR в систему Extended RAS Panel с MAP использовали валидированную программу загрузки (LRM Uploader). Вторичный анализ данных провели дважды — сначала в п/о с MSR, и затем в п/о с MAP, устранив, таким образом, все источники вариабельности анализа, кроме различий, связанных с использованием программного оборудования. Исходные данные (в виде файлов *.vcf), полученные с использованием п/о Extended RAS Panel с MSR, сравнивали с результатами повторного анализа, проведенного п/о Extended RAS Panel с MAP.

Результаты исследования показали аналитическую эквивалентность п/о Extended RAS Panel с MSR и п/о Extended RAS Panel с MAP. Все критерии приемлемости были удовлетворены, аналитическая эквивалентность двух вариантов архитектуры программного обеспечения была продемонстрирована.

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel предназначен для определения мутаций *KRAS* и *NRAS*, перечисленных в таблице: интерпретация результатов.

Таблица: интерпретация результатов

Хромосома	Ген	Экзон	Аминокислота	Дикий тип > Мутация
chr12	KRAS	2	p.Gly13Val	c.38_39GC>TT
chr12	KRAS	2	p.Gly13Glu	c.38_39GC>AA
chr12	KRAS	2	p.Gly13Asp	c.38_39GC>AT
chr12	KRAS	2	p.Gly13Asp	c.38G>A
chr12	KRAS	2	p.Gly13Cys	c.37G>T
chr12	KRAS	2	p.Gly13Arg	c.37G>C
chr12	KRAS	2	p.Gly12Trp	c.34_36GGT>TGG
chr12	KRAS	2	p.Gly12Ala	c.35G>C
chr12	KRAS	2	p.Gly12Asp	c.35G>A
chr12	KRAS	2	p.Gly12Phe	c.34_35GG>TT
chr12	KRAS	2	p.Gly12Asn	c.34_35GG>AA
chr12	KRAS	2	p.Gly12Val	c.35G>T
chr12	KRAS	2	p.Gly12Ser	c.34G>A
chr12	KRAS	2	p.Gly12Cys	c.34G>T
chr12	KRAS	2	p.Gly12Arg	c.34G>C
chr12	KRAS	3	p.Gln61His	c.183A>C
chr12	KRAS	3	p.Gln61His	c.183A>T
chr12	KRAS	3	p.Gln61Leu	c.182A>T
chr12	KRAS	3	p.Gln61Arg	c.182A>G
chr12	KRAS	3	p.Gln61Lys	c.181C>A
chr12	KRAS	3	p.Gln61Glu	c.181G
chr12	KRAS	3	p.Ala59Gly	c.176C>G
chr12	KRAS	3	p.Ala59Thr	c.175G>A
chr12	KRAS	4	p.Ala146Val	c.437G>T
chr12	KRAS	4	p.Ala146Thr	c.436G>A
chr12	KRAS	4	p.Ala146Pro	c.436G>C
chr12	KRAS	4	p.Lys117Asn	c.351A>T
chr12	KRAS	4	p.Lys117Asn	c.351A>C
chr1	NRAS	2	p.Gly13Glu	c.38_39GT>AG
chr1	NRAS	2	p.Gly13Glu	c.38_39GT>AA
chr1	NRAS	2	p.Gly13Asp	c.38G>A
chr1	NRAS	2	p.Gly13Val	c.38G>T
chr1	NRAS	2	p.Gly13Cys	c.37G>T
chr1	NRAS	2	p.Gly13Arg	c.37G>C
chr1	NRAS	2	p.Gly12Trp	c.34_36GGT>TGG
chr1	NRAS	2	p.Gly12Ala	c.35G>C
chr1	NRAS	2	p.Gly12Val	c.35G>T
chr1	NRAS	2	p.Gly12Asp	c.35G>A
chr1	NRAS	2	p.Gly12Phe	c.34_35GG>TT
chr1	NRAS	2	p.Gly12Asn	c.34_35GG>AA
chr1	NRAS	2	p.Gly12Ser	c.34G>A
chr1	NRAS	2	p.Gly12Cys	c.34G>T
chr1	NRAS	2	p.Gly12Arg	c.34G>C
chr1	NRAS	3	p.Gln61His	c.183A>T
chr1	NRAS	3	p.Gln61His	c.183A>C
chr1	NRAS	3	p.Gln61Arg	c.182A>G
chr1	NRAS	3	p.Gln61Leu	c.182A>T
chr1	NRAS	3	p.Gln61Lys	c.181G>A

* протоонкоген *KRAS*, GTP-аза [Homo sapiens (человек)] (ID гена: 3845) - NM_004985.4, NP_004976.2.

* гомолог вирусного онкогена RAS лейкобластомы *NRAS* [Homo sapiens (человек)] (ID гена: 4893) - NM_002524.4, NF_002515.1.

Отчет Praxis Extended RAS Panel включает данные о прохождении прогона и наличии какой-либо мутации, из перечисленных в референтной панели. Анализ контрольных образцов, входящих в состав набора, позволяет выявить различия в процессировании и техническом выполнении процедур среди лабораторий, которые могут значимо влиять на вариабельность результатов. Для определения валидности прогона секвенирования используются положительные и отрицательные контроли.

Результаты анализа представляются в отчете, как показано в таблице: **Результаты анализа.**

Таблица: Результаты анализа

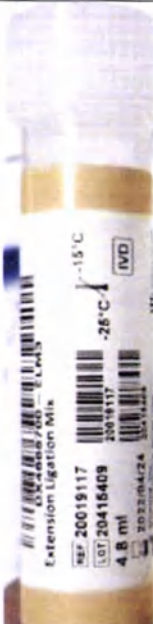
Заголовок	Описание
Название образца	Наименование образца указывают при создании прогона
Образец	Образец Определение качества: Соотв. - наличие или отсутствие мутаций, входящих в панель Не соотв. - Наличие или отсутствие мутаций, входящих в панель, определить невозможно
Результат	Результат обнаружения мутаций в образце Мутация, входящая в панель , выявлена - имеется мутация, входящая в панель. Список выявленных мутаций, входящих в панель. Мутация, входящая в панель , не выявлена - отсутствует мутация, входящая в панель.
Ген	Ген <i>KRAS</i> и <i>NRAS</i> , в котором выявлена мутация, если применимо
Экзон	Номер экзона, в котором выявлена мутация, если применимо
Аминокислота	Обозначение аминокислотной замены по номенклатуре Общества по исследованию вариаций генома человека (HGVS: Human Genome Variation Society).
Нуклеотид	обозначение нуклеотидной замены по HGVS

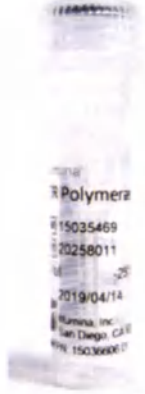
11.3. Описание компонентов (частей) медицинского изделия

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel (PN 20012431) компании «Иллюмина» (Illumina) состоит из следующих компонентов, перечисленных в таблице: Компоненты Praxis Extended RAS Panel.

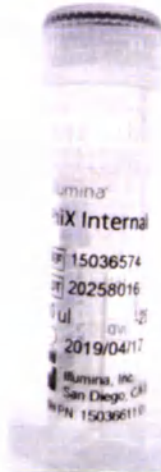
Таблица: Компоненты Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel, PN 20012431

Примечание: данные о pH не приводятся, если не указано обратное.

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 1, PN 20012195: Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 1A, PN 20012196:			
Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer) PN 15035442		Количество: 1 пробирка Объем: 4,32мл Размеры: Пробирка: H: 92,0 мм x D: 15,0 мм ± 10 % Крышка: H: 18,0 мм x D: 17 мм ± 10 %	Водный буферный раствор, содержащий соли и формамид Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха или со слабым запахом
Смесь для удлинения- лигирования (Extension-Ligation Mix) PN 20019117		Количество: 1 пробирка Объем: 4,8мл Размеры: Пробирка: H: 92,0 мм x D: 15,0 мм ± 10 % Крышка: H: 18,5 мм x D: 17 мм ± 10 %	Водный буферный раствор, содержащий патентованную смесь ДНК-полимеразы, ДНК- лигазы и dNTP Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508)) PN: 15035449, 15035450,		Количество: 1 пробирка Объем: 192 мкл Размеры: Пробирка: H: 42,0 мм x	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования Внешний вид: бесцветная жидкость

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
15035451, 15035452, 15035453, 15035454, 15035455, 15035456		D: 8,7 мм ± 10 % Крышка: H: 14,1 мм х D: 8,7 мм ± 10 % Силиконовое кольцо: H: 4,4 мм х D: 1,7 мм ± 10 %	Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха или со слабым запахом
Праймеры индексированные 1 (A701) - 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712)) PN: 15035457, 15035458, 15035459, 15035460, 15035461, 15035462, 15035463, 15035464, 15035465, 15035466, 15035467, 15035468		Количество: 1 пробирка Объем: 128 мкл Размеры: Пробирка: H: 42,0 мм х D: 8,7 мм ± 10 % Крышка: H: 14,1 мм х D: 8,7 мм ± 10 %	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования Внешний вид: желтая жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: желтый Запах: без запаха
ПЦР полимеразы (PCR Polymerase) PN 15035469		Количество: 1 пробирка Объем: 56 мкл Размеры: Пробирка: H: 43,0 мм х D: 10,0 мм ± 10 % Крышка: H: 13,0 мм х D: 10,0 мм ± 10 %	Количество ДНК- полимеразы Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Смесь для ПЦР (PCR Master Mix) PN 15035448		Количество: 1 пробирка Объем: 2,8 мл Размеры: Пробирка: H:92,0 мм х D:15,0 мм ± 10 % Крышка: H:18,0 мм х D:17 мм ±10%	Водный буферный раствор, содержащий соли и dNTP Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 1, PN 20012195: Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 1B, PN 20012197:			
Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) PN 15035473		Количество: 1 пробирка Объем: 4,6 мл Размеры: Пробирка: H:92,0 мм х D:15,0 мм ± 10 % Крышка: H:18,0 мм х D:17 мм ±10%	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: содержит 2- меркаптоэтанол
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) PN 20004095		Количество: 2 пробирки Объем: 4,5 мл Размеры: Пробирка: H:92,0 мм х D:15,0 мм ± 10 % Крышка: H:18,0 мм х D:17 мм ±10%	Водный буферный раствор Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха или со слабым запахом pH: 8.5

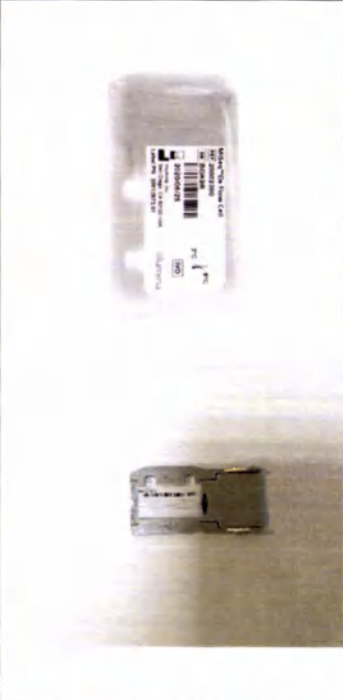
Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) PN 15036574		Количество: 1 пробирка Объем: 10 мкл Размеры: Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,8 мм ± 10 % Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм ± 10 %	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК PhiX Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 2, PN 20012198:			
Картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3) PN 20002301		Количество: 2 картриджа Объем: предварительно заполненный Размеры: Картридж: Длина A: 210 мм ± 10% Длина B: 190 мм ± 10% Ширина: 93 мм ± 10% H: 80 мм ± 10% Порты: D: 10,0 мм ± 10 %	Картридж однократного применения, содержащий реагенты для образования кластеров и секвенирования для применения с генетическим секвенатором MiSeqDx, в том числе формамид, 2-меркаптоэтанол и < 2 % ДМСО Объем подготовлено (разведенного) образца библиотеки для загрузки в картридж – 600 мкл
Состав картриджа:			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха или со слабым запахом
DX#-LPM DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) LPM: Long-amp Primer Mix (Смесь для линеаризации праймеров) PN 15045585			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный
DX#-LDR, Formamide (Формамид) DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики)			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
LDR: Denaturation Reagent (Реагент для денатурации) PN 15045586			Запах: без запаха
DX#-PWI, WASH BUFFER 1, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) PWI: Washer Buffer 1 (Промывочный буфер 1) PN 15045594			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-IMT, Incorporation Mix, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) IMT: Incorporation Mix (Смесь реагентов Incorporation) PN 20011198			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-USM, UnivSCAN MIX, 600- CYC, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) USM: Universal Scan Mix (Смесь универсальная Scan, 600-CYC) PN 20011199			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-CMS, CLEAVE MIX,500- CYC, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) CMS: Cleave Mix (Смесь CLEAVE,500- CYC) PN 20011210			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-AMS1, AMP MIX, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) AMS1: Amplification Mix 1 (Смесь для амплификации 1) PN 20011211			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха или со слабым запахом
DX#-AMS2, AMP MIX, DX#: abbreviation for			Внешний вид: бесцветная жидкость

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
diagnosis (сокращение для диагностики) AMS2: Amplification Mix 2 (Смесь для амплификации 2) PN 20011212			Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-LMX1, LINEAR MIX READ 1, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) LMX1: Linear Mix Read 1 (Смесь для считывания линеаризации 1) PN 20011213			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-LMX2, LINEAR MIX READ 2 DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) LMX2: Linear Mix Read 2 (Смесь для считывания линеаризации 2) PN 20011214			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-RMF, RESYN MIX FAST DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) RMF: Resynthesis Mix Fast (Смесь для быстрого повторного синтеза) PN 20011215			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: содержит 2- меркаптоэтанол
DX#-HP10, PRMR MIX, READ 1 DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) HP10: Primer Mix Read 1 (Смесь праймеров для считывания 1) PN 20011216			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
DX#-HP11, PRMR MIX, READ 2 DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) HP11: Primer Mix Read 2 (Смесь праймеров для считывания 2) PN 20011217			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
DX#-HP12, PRMR MIX, INX 1, DX#: abbreviation for diagnosis (сокращение для диагностики) HP12: Primer Mix Index (Смесь индексированных праймеров 1) PN 20011218			Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 3, PN 20012199: Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 3A, PN 20012200:			
Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer) PN 15035443		Количество: 1 флакон Объем: 24 мл Размеры: Флакон: H:82,0 мм x D:37,0 мм ±10 % Крышка: H:15,0 мм x D:26,0 мм ±10 %	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2- Меркаптоэтанол и формамид Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: содержит 2- меркаптоэтанол
Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer) PN 20004092		Количество: 1 пробирка Объем: 4,8 мл Размеры: Пробирка: H:92,0 мм x D:15,0 мм ± 10 % Крышка: H:18,0 мм x D:17 мм ±10%	Водный буферный раствор, содержащий соли Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 3, PN 20012199: Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 3B, PN 20012201:			

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Микрочастицы для очистки ПЦР- продуктов (PCR Clean-Up Beads) PN 15036674		Количество: 1 пробирка Объем: 5 мл Размеры: Пробирка: H:92,0 мм x D:15,0 мм ± 10 % Крышка: H:18,0 мм x D:17 мм ±10%	Водный буферный раствор, содержащий твёрдофазные парамагнитные гранулы и полиэтиленгликоль Внешний вид: коричневая жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: коричневый Запах: без запаха pH: 8,5
Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash) PN 15035446		Количество: 2 пробирки Объем: 4,8 мл Размеры: Пробирка: H:92,0 мм x D:15,0 мм ± 10 % Крышка: H:18,0 мм x D:17 мм ±10%	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид Внешний вид: жидкость, цвет от светло-коричневого до бесцветного Физическая форма: жидкость Цвет: от светло- коричневого до бесцветного Запах: содержит 2- меркаптоэтанол
Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) PN 20017098		Количество: 1 пробирка Объем: 1.2 мл Размеры: Пробирка: H:42,0 мм x D: 11,0 мм ± 10 % Крышка: H: 14,1 мм x D: 11,0 мм ± 10 %	Водный буферный раствор, содержащий твёрдофазные парамагнитные гранулы Раствор: Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха Микрочастицы: Внешний вид: коричневые микрочастицы

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
			Физическая форма: микрочастицы Цвет: коричневый Запах: без запаха
Ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell) PN 20002300		Количество: 2 резервуара Объем: 1 ячейка на резервуар Размеры: Резервуар: H: 60,0 мм х D: 29,4 мм ± 10 % Проточная ячейка: H: 50,0 мм х H: 27,0 мм х D: 30,0 мм ± 10 %	Стеклянная подложка с ковалентно связанными олигонуклеотидами Резервуар: Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха Проточная ячейка: Внешний вид: н/п Физическая форма: н/п Цвет: н/п Запах: н/п
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 4, PN 20012202:			
Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2) PN 20002209		Количество: 2 флакона Объем: 500 мл Размеры Флакон: H: 175,0 мм х D: 76,0 мм ± 10 % Крышка: D: 40,0 мм ± 10 %	Водный буферный раствор Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Реагенты для пре- и пост-амплификации, коробка 5, PN 20012203: Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 5:			

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate) PN 20012590		Количество: 2 планшета Объем: н/п Размеры L: 128,0 мм x H: 86,0 мм x D: 18,0 мм ± 10 %	Полипропиленовый микропланшет с мембраной из модифицированного полиэфирсульфона Внешний вид: н/п Физическая форма: н/п Цвет: н/п Запах: н/п

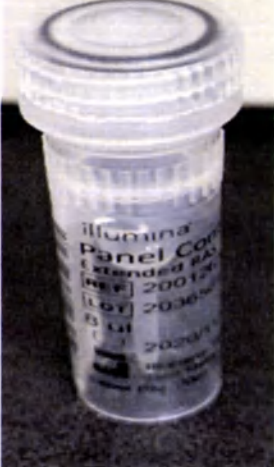
Реагенты для пре- и пост-амплификации, коробка 5, PN 20012203:
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 5:

Буфер для элюции (Elution Buffer) PN 20004093		Количество: 1 пробирка Объем: 4,8 мл Размеры Пробирка: H: 92,0 мм x D: 15,0 мм ± 10 % Крышка: H: 18,0 мм x D: 17 мм ± 10 %	Водный буферный раствор Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
---	--	--	---

Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer) PN 20004094		Количество: 1 пробирка Объем: 3,5 мл Размеры Пробирка: H: 92,0 мм x D: 15,0 мм ± 10 % Крышка: H: 18,0 мм x D: 17 мм ± 10 %	Водный буферный раствор Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
--	---	--	---

Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 6, PN 20012204:

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) PN 20012624		Количество: 1 пробирка Объем: 150 мкл Размеры Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,5 мм ±10% Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм ±10 %	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды, нацеленные на гены RAS Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: прозрачная Запах: без запаха
Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) PN 20012625		Количество: 1 пробирка Объем: 150 мкл Размеры Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,5 мм ±10% Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм ± 10 %	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды, нацеленные на гены RAS Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers) PN 20004096		Количество: 4 пробирки Объем: 75 мкл Размеры Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,5 мм ±10% Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм ±10 %	Водный буферный раствор, содержащий олигонуклеотиды для оценки качества образца ДНК Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) PN 20004097		Количество: 1 пробирка Объем: 220 мкл Размеры Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,5 мм $\pm 10\%$ Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм $\pm 10\%$	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК для оценки качества образцов Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix) PN 20004098		Количество: 2 пробирки Объем: 1 мл Размеры Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,5 мм $\pm 10\%$ Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм $\pm 10\%$	Водный буферный раствор, содержащий компоненты кПЦР Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха
Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS) PN 20012626		Количество: 1 пробирка Объем: 8 мкл Размеры Пробирка: H: 46,0 мм x D: 10,5 мм $\pm 10\%$ Крышка: H: 13,0 мм x D: 12,0 мм $\pm 10\%$	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК для положительного контроля Внешний вид: бесцветная жидкость Физическая форма: жидкость Цвет: бесцветный Запах: без запаха pH: 8

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Инструкция по применению PN 15054121	 Praxis® Extended RAS Panel Praxis® Extended RAS Panel is a quantitative, colorimetric test using targeted high throughput parallel sequencing to detect the presence of specific mutations in RAS genes (KRAS, NRAS, HRAS, and BRAF). The test is performed on a 96-well plate and is suitable for use in a laboratory setting. The Praxis® Extended RAS Panel is a quantitative, colorimetric test using targeted high throughput parallel sequencing to detect the presence of specific mutations in RAS genes (KRAS, NRAS, HRAS, and BRAF). The test is performed on a 96-well plate and is suitable for use in a laboratory setting. The Praxis® Extended RAS Panel is a quantitative, colorimetric test using targeted high throughput parallel sequencing to detect the presence of specific mutations in RAS genes (KRAS, NRAS, HRAS, and BRAF). The test is performed on a 96-well plate and is suitable for use in a laboratory setting.	Количество: 1 шт. Объем: н/п Размеры: н/п	Описание: Инструкция по применению для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel Бумага без покрытия белого цвета
Руководство справочное PN 15054440	 Praxis® Extended RAS Panel Reference Guide This reference guide provides detailed information about the Praxis® Extended RAS Panel, including its components, storage conditions, and handling instructions. It is intended for use by laboratory personnel who are responsible for the performance of the test. The Praxis® Extended RAS Panel is a quantitative, colorimetric test using targeted high throughput parallel sequencing to detect the presence of specific mutations in RAS genes (KRAS, NRAS, HRAS, and BRAF). The test is performed on a 96-well plate and is suitable for use in a laboratory setting.	Количество: 1 шт. Объем: н/п Размеры: н/п	Описание: Руководство справочное для Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel Бумага без покрытия белого цвета

Компонент/ Номер по каталогу (PN)	Фотографии	Количество, объем/заполнени е, размеры: высота (H) длина (L) диаметр (D)	Активные ингредиенты, pH и физические и химические свойства
Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis™ Extended RAS Panel PN 1000000011875		Количество: 1 шт. Объем: н/п Размеры: н/п	Описание: Справочное руководство для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis Extended RAS Panel Бумага без покрытия белого цвета

11.4. Функциональное назначение компонентов медицинского изделия

Компонент	Функциональное назначение
Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 1A:	
Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)	Водный буферный раствор, содержащий соли и денатурированные вещества для гибридизации олигонуклеотидов на геномной ДНК.
Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)	Водный буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и ДНК-лигазу, катализирующие присоединение locus-специфичных олигонуклеотидов, находящихся выше по последовательности, к олигонуклеотидам, находящимся ниже по последовательности.
Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501))	Восемь (A501-A508) и двенадцать (A701-A712) индексированных праймеров ПЦР для универсальной амплификации лигированных продуктов. Праймеры включают последовательность-метку, специфичную образцу. В праймеры также включены последовательности P5 и P7, комплементарные последовательностям нуклеотидов захвата, фиксированных в ячейке проточной.
Праймеры индексированные 1 (A701) -12 (A712) (Index Primers 1 (A701))	
ПЦР полимераз (PCR Polymerase)	ДНК-полимераза используется на этапе ПЦР.
Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)	Водный буферный раствор, содержащий соли и dNTP, необходимые для ПЦР-амплификации.
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 1B:	

Компонент	Функциональное назначение
Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)	Водный буферный раствор, используемый для разведения микрогранул для нормализации библиотеки перед процедурой нормализации образца при помощи микрогранул.
Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)	Водный буферный раствор, используемый для разведения образца библиотек перед загрузкой в картридж MiSeqDx SBS v3 (MiSeqDx SBS Cartridge v3)
Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК PhiX (готовая библиотека), который добавляют в нормализованный образец библиотеки перед загрузкой в картридж MiSeqDx SBS v3 (MiSeqDx SBS Cartridge v3). Используется для выявления проблем секвенирования.
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 2:	
Картридж MiSeq TM Dx SBS v3 (MiSeq TM Dx SBS Cartridge v3)	Картридж однократного применения, содержащий реагенты для образования кластеров и секвенирования. Объединенные библиотеки добавляют в картридж, картридж вставляют в генетический секвенатор MiSeqDx,
Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 3A:	
Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)	Буфер для интенсивной промывки с низкой концентрацией солей используют для удаления негибридизированных олигонуклеотидов из образца на планшете для фильтрации.
Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)	Солевой буфер используют для удаления избытка буфер для интенсивной промывки из образца на планшете для фильтрации, подготовленного для удлинения-лигирования.
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 3B:	
Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads)	Магнитные микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов.
Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид, используется для удаления несвязавшихся ампликонов в процессе нормализации образца при помощи микрогранул.
Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)	Водный буферный раствор, содержащий твердофазные парамагнитные микрочастицы, позволяющие нормализовывать количество продуктов ПЦР, полученных для разных образцов.
Ячейка проточная MiSeq TM Dx (MiSeq TM Dx Flow Cell)	Одноразовая стеклянная подложка с ковалентно связанными олигонуклеотидами для захвата и твердофазной амплификации и секвенирования целевых последовательностей, созданных при приготовлении библиотеки.
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 4	

Компонент	Функциональное назначение
Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))	Водный буферный раствор, применяется в процессе секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx для промывания проточной ячейки между разными ферментативными реакциями.
Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 5	
Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)	Полипропиленовый микропланшет с мембраной из модифицированного полиэфирсульфона. Используется для удаления негибридизированных олигонуклеотидов и проведения реакции элонгации-лигирования.
Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 5	
Буфер для элюции (Elution Buffer)	Буферный раствор используют для элюирования ПЦР-продуктов с микрочастиц для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) после этапа очистки.
Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)	Водный буферный раствор для хранения нормализованных образцов библиотеки.
Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 6	
Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)	Два пула олигонуклеотидов (A и B), нацеленные на области интереса соответствующих цепей ДНК, с адаптерами, комплементарными универсальным праймерам амплификации.
Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)	
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	Олигонуклеотидные праймеры для контроля качества образцов.
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)	Контрольная матрица геномной ДНК для оценки качества образцов.
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	Водный буферный раствор, содержащий компоненты кПЦР.
Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)	Геномная ДНК с мутациями специфических аллельных последовательностей <i>KRAS</i> и <i>NRAS</i> для использования в качестве положительного контроля.

2.2 11.5. Состав медицинского изделия

Таблица: входящие в состав материалы

В коробке 1 из 6 находятся две коробки: 1А и 1В, как показано в таблице: **Коробки (1А и 1В)**

Компоненты и входящие в состав материалы

Таблица: Коробки (1А и 1В) Компоненты входящие в состав материалы

Коробка	Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Коробка 1А	Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)	15035442	Вода Super Q или эквивалент
			Натрия гидрофосфат 1 моль/л
			Натрия хлорид 0,5 моль/л
			Моногидрат лимонной кислоты 2,8 моль/л
			0,5 моль/л ЭДТА
			Формамид
			10 % Твин 80
	Смесь для удлинения-	20019117	Вода Super Q или эквивалент - Premix Буфер Трис 1 моль/л pH 7,9- Premix

Коробка	Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
	лигирования (Extension-Ligation Mix)		Магния сульфат 1 моль/л - Premix
			Натрия хлорид 5 моль/л, сверхчистый - Premix
			Сахароза 50 % - Premix
			DTT (DL-дитиотреитол) 1 моль/л - Premix
			Пул dNTP - Premix
			10 % Тритон X – 100, сверхчистый - Premix
			NAD 50 ммоль/л (Spike)
			ДНК-лигаза E. Coli - Spike
			T4 ДНК-полимераза - Spike
	Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508))	15035449-15035456	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования
	Праймеры индексированные 1 (A701) -12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712))	15035457-15035468	Праймеры для ПЦР с индексными последовательностями и адаптерами секвенирования
	ПЦР полимераза (PCR Polymerase)	15035469	Полимераза является единственным полимеризующим реагентом ПЦР
	Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)	15035448	Вода Super Q или эквивалент - Premix
			Буфер Трис 1 моль/л pH 7,5 - Premix
			Магния сульфат 1 моль/л - Premix
			Бетаин 5 моль/л - Premix
			Сахароза 50 % - Premix
			Brij 58 (Surfact – Amps 58, 10% водный раствор) – Premix (раствор детергента высокой очистки)
			Пул dNTP – Spike
	Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)	15035473	Вода Super Q или эквивалент
			Натрия гидрофосфат 1 моль/л
			Натрия хлорид 5 моль/л
			Моногидрат лимонной кислоты 2,8 моль/л
			2-меркаптоэтанол (BME)
			0,5 моль/л ЭДТА
			Формамид
			10 % Твин 80
Коробка 1B	Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)	20004095	Вода Super Q или эквивалент Буфер 20X SSC (Натрия хлорид 3 моль/л, натрия цитрат 0,3 моль/л) 10 % Твин 20
	Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)	15036574	Водный буферный раствор

Коробка 2:

В коробке 2 из 6 содержится Картридж MiSeqTM Dx SBS v3 (MiSeqTM Dx SBS Cartridge v3). Исходные материалы компонентов картриджа перечислены в таблице: **Компоненты картриджа и материалы, использованные при изготовлении.**

Таблица: Компоненты картриджа PN 20002301 и материалы, использованные при изготовлении.

Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Смесь реагентов (Incorporation Mix, IMT) (Premix)	20011198	Вода очищенная
		Этаноламин
		Этаноламин HCl
		Натрия хлорид
		0,5 моль/л ЭДТА
		Магния сульфат
		Накладки
Смесь реагентов (Incorporation Mix, IMT) (Spike)		FFT-N3-NR550SO, 100 мкмоль/л (Нуклеотид)
		G-N3-PEG12-ATTO532, 100 мкмоль/л (Nanocs Полиэтиленгликоль и флуоресцентный краситель)
		FFA-N3-SO7181, 100 мкмоль/л (флуоресцентный краситель)
		Assy, FFC-N3-CA690 125 мкмоль/л
		SBS DNA Pol 963 (ДНК-полимераза)
		Буфер для хранения Pol 217
		Универсальная смесь Scan (Premix) (Universal Scan Mix (Premix))
Тризма гидрохлорид		
Тризма основание		
100 % Твин 20		
Аскорбат натрия		
Гидроксизтил галлат		
Смесь (Cleave Mix (Premix))	20011210	Вода очищенная
		Этаноламин
		Этаноламин HCl
		Натрия хлорид
		100 % Твин 20
		Аскорбат натрия
Смесь (Cleave Mix (Spike))		1M THP
Смесь для амплификации 1 (Premix) (Amplification Mix 1 (Premix))	20011211	Вода очищенная
		Трис HCl
		Трис основание
		Бетаин
		Аммония сульфат
		Магния сульфат
		Диметилсульфоксид (ДМСО)
		100 % Тритон X-100
		Пул dNTP, 25 ммоль/л
Смесь для амплификации 1 (Spike) (Amplification Mix 1 (Spike))	ДНК-полимераза DisplaceAce	
Смесь для амплификации 2 (Amplification Mix 2)	20011212	В состав входят такие же реагенты, как в смесь для амплификации 1
Смесь для линейаризации Premix (Linearization Premix)	15045585	Вода Super Q или эквивалент
Формаид (Formamide)	15045586	Формаид, 100 %
		Тринатрийцитрат, 1 моль/л
	20011213	Вода очищенная

Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Смесь для считывания линеаризации 1 (Linearization Mix Read 1) (Premix)		Трис HCl
		Трис основание
		Натрия хлорид
		Сахароза
		Магния сульфат
		Раствор ЭДТА 0,5 моль/л
		100 % Твин-20
Смесь для считывания линеаризации 1 (Linearization Mix Read 1) (Spike)	15045585	Урациловая эксцизионная смесь (Uracil Excision Mix)
Смесь для считывания линеаризации 2 (Linearization Mix Read 2)	20011214	В состав входят те же компоненты, что и в смесь Mix Read 1 (Premix) и Spike с ферментом E.Coli FPG.
Смесь (Resynthesis Mix Fast (Premix))	20011215	Вода очищенная
		Имидазол HCl
		Имидазол
		Сахароза
		Магния хлорид 1 моль/л
		BME/2-меркаптоэтанол
Смесь (Resynthesis Mix Fast (Spike))		4 PNK (T4 полинуклеотидкиназа)
Смесь праймеров для считывания 1(Primer Mix Read 1)	20011216	Вода очищенная
		20X SSC буфер
		100 % Твин 20
		Смесь праймеров для считывания (HP 10 Primer Mix Read 1)
Смесь индексированных праймеров для считывания 1 (Primer Mix Index 1)	20011218	Вода очищенная
		20X SSC буфер
		100 % Твин 20
		Смесь индексированных праймеров (HP12 Primer Mix Index 1)
Смесь праймеров для считывания 2 (Primer Mix Read 2)	20011217	Вода очищенная
		20X SSC буфер
		100 % Твин 20
		Смесь индексированных праймеров (HP11 Primer Mix Index 2)
Промывочный буфер 1 (Wash Buffer 1)	15045594	Вода Super Q или эквивалент

Коробка 3:

В коробке 3 из 6 набора реагентов Praxis Extended RAS Panel находятся две коробки: 3А и 3В, как показано в таблице: **Коробка 3 из 6: компоненты и входящие в состав материалы**

Таблица: Компоненты коробки 3 из 6

Коробка	Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Коробка 3А	Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)	15035443	Водный буферный раствор, содержащий соли, 2-меркаптоэтанол и формамид
		20004092	Вода очищенная
			Тризма гидрохлорид, HCl Тризма основание (Трис основание)

Коробка	Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Коробка 3В	Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)		NaCl твердый
			Калия хлорид
			Аммония сульфат
			Магния сульфат
			10 % Тритон X-100
			Бетаин
Коробка 3В	Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads)	15036674	Микрочастицы Ampure XP Bead (для очистки продуктов ПЦР)
	Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)	15035446	Вода Super Q или эквивалент
			Раствор 4X OWB Solution (без ДНК молок лосося)
			Формамид
	Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)	20017098	Вода Super Q или эквивалент
			Буфер Трис 1 моль/л pH 8,0
			Натрия хлорид 5 моль/л
	Ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell)	20002300	Сама по себе ячейка проточная изготовлена из двух слоев бесцветного, прозрачного стекла, склеенных вместе.

Коробка 4:

В коробке 4 из 6 Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel содержится Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)). Состав материалов для Буфера MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)) представлен в таблице: Состав Буфера MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)).

Таблица: Состав Буфера MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)).

Входящие в состав материалы
Вода очищенная
Тризма гидрохлорид, HCl
Тризма основание (Трис основание)
Натрия хлорид
Раствор ЭДТА 0,5 моль/л
100 % Твин 20
Проклин 300

Коробка 5:

В коробке 5 из Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel находятся три компонента, как показано в таблице: Коробка 5: Компоненты и входящие в состав материалы

Таблица: Коробка 5 из 6: Компоненты и входящие в состав материалы

Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)	20012590	Полипропиленовый микропланшет с мембраной из модифицированного полиэфирсульфона

Буфер для элюции (Elution Buffer)	20004093	Вода очищенная, Illumina
		Трис 1 моль/л pH 8,5
		Раствор ЭДТА 0,5 моль/л
		100 % Твин 20
Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)	20004094	Водный буферный раствор

Коробка 6:

В коробке 6 из Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel находится шесть компонентов, как показано в таблице: **Коробка 6: Компоненты и входящие в состав материалы**

Таблица: Коробка 6: Компоненты и входящие в состав материалы

Описание компонента	Компонент, PN	Входящие в состав материалы
Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)	20012624	Буфер 1X TE
		Пул праймеров A
Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)	20012625	Буфер 1X TE
		Пул праймеров B
Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)	20004096	Вода Super Q или эквивалент
		Буфер Трис 1 моль/л
		Праймеры 204AluF 1 ммоль/л
		Праймеры AluR 1 ммоль/л
ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)	20004097	Вода Super Q или эквивалент
		Буфер Трис 1 моль/л, pH 7,0
		0,5 моль/л ЭДТА
		10 % Твин 20
Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)	20004098	Водный буферный раствор, содержащий компоненты реакции количественной ПЦР
Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)	20012626	Водный буферный раствор, содержащий геномную ДНК

11.6. Компоненты медицинского изделия и их описание

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel включает шесть коробок, инструкцию по применению, руководство справочное, руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа Praxis Extended RAS Panel. Входящие в состав компоненты перечислены ниже:

Коробка 1 из 6

Коробка 1A	
Номер компонента	Описание
15035442	Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)
20019117	Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)

15035449-15035456	Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508))
15035457-15035468	Праймеры индексированные 1 (A701) - 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712))
15035469	ПЦП полимеразы (PCR Polymerase)
15035448	Смесь для ПЦП (PCR Master Mix)
Коробка 1В	
15035473	Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)
20004095	Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)
15036574	Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)

Коробка 2 из 6

Коробка 2	
Картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3)	
Номер компонента	Описание
20011198	Смесь реагентов (Incorporation Mix, IMT)
20011199	Смесь универсальная Scan (Universal Scan Mix)
20011210	Смесь (Cleave Mix)
20011211	Смесь для амплификации 1 (Amplification Mix 1)
20011212	Смесь для амплификации 2 (Amplification Mix 2)
15045585	Смесь для линейаризации Premix (Linearization Premix)
15045586	Формамид (Formamide)
20011213	Смесь для считывания линейаризации 1 (Linearization Mix Read 1)
20011214	Смесь для считывания линейаризации 2 (Linearization Mix Read 2)
20011215	Смесь (Resynthesis Mix Fast)
20011216	Смесь праймеров для считывания 1 (Primer Mix Read 1)
20011217	Смесь индексированных праймеров для считывания 1 (Primer Mix Index 1)
20011218	Смесь праймеров для считывания 2 (Primer Mix Read 2)
15045594	Промывочный буфер 1 (Wash Buffer 1)

Коробка 3 из 6

Коробка 3А	
Номер компонента	Описание
15035443	Буфер для интенсивной отмычки (Stringent Wash Buffer)
20004092	Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)
Коробка 3В	
15036674	Микрочастицы для очистки ПЦП-продуктов (PCR Clean-Up Beads)
15035446	Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)
20017098	Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)

20002300	Ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell)
----------	--

Коробка 4 из 6

Коробка 4 Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))	
Номер компонента	Описание
20002209	Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2))

Коробка 5 из 6

Номер компонента	Описание
20012590	Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)
20004093	Буфер для элюции (Elution Buffer)
20004094	Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)

Коробка 6 из 6

Номер компонента	Описание
20012624	Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)
20012625	Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)
20004096	Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)
20004097	ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)
20004098	Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)
20012626	Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)

Инструкция по применению – 1 шт.

Руководство справочное – 1 шт.

Руководство справочное для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа
Illumina MiSeq™ Extended RAS Panel – 1 шт.

12. Перечень и описание материалов медицинского изделия, непосредственно или опосредовано контактирующих с пациентом (организмом человека)

Не применимо.

13. Описание маркировки и упаковки медицинского изделия

13.1 Транспортная упаковка

Транспортная упаковка содержит следующую информацию:

- торговое и полное наименование изделия;
- наименование и адрес изготовителя изделия;
- товарный знак
- требования к условиям хранения и транспортирования изделия;
- номер партии;
- предупреждения и меры предосторожности в отношении изделия, которые необходимо исполнять, манипуляционные надписи;
- число единиц потребительской упаковки изделий в групповой упаковке, многооборотной таре или транспортной таре;
- масса нетто и масса брутто на групповой упаковке изделий, многооборотной таре или транспортной таре;
- номер заказа;
- масса нетто сухого льда (для коробок с сухим льдом).

Коробка	Описание	Фотографии
Коробки 1, 2, 6 Условия хранения (-25 °C до -15 °C)	Коробки помещены в контейнер с сухим льдом (Dry Ice) и контейнер помещен в коробку из гофрированного картона.	 

Коробки 3, 4 Условия хранения: от 2 °C до 8 °C	Коробки помещаются в гофрированную картонную коробку с синими упаковками охлаждающего льда/геля (Blue Ice/Gel).	
Коробка 5 Условия хранения (15°C до 30°C)	Коробки, хранящиеся при комнатной температуре и не требующие хранения в холоде, помещены в коробку из гофрированного картона.	

Маркировка:

Маркировка номера заказа:

ORDER NUMBER :

NUMBER OF PIECES :

_____ OF _____

TOTAL GROSS WEIGHT :

Маркировка для транспортной коробки с сухим льдом:

Shippers Declaration not Required.

Part B is Required

Dry Ice amount must be in kilograms

Note 2 lbs. = 1 kg.

Airwaybills/Airbills must have the following:

1. "Dangerous Goods - Shippers Declaration not required"
2. Dry Ice 9; UN1845;
3. _____ x _____ Kg (il)

DRY ICE
_____ kg.

Shippers Name and Address
ILLUMINA, INC.
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122
USA

UN1845

9

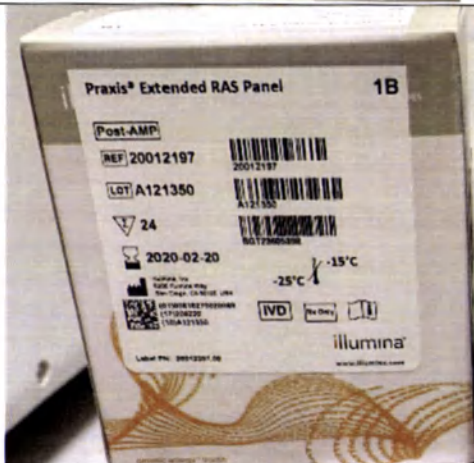
Consignee Name and Address

Антерпретация символов

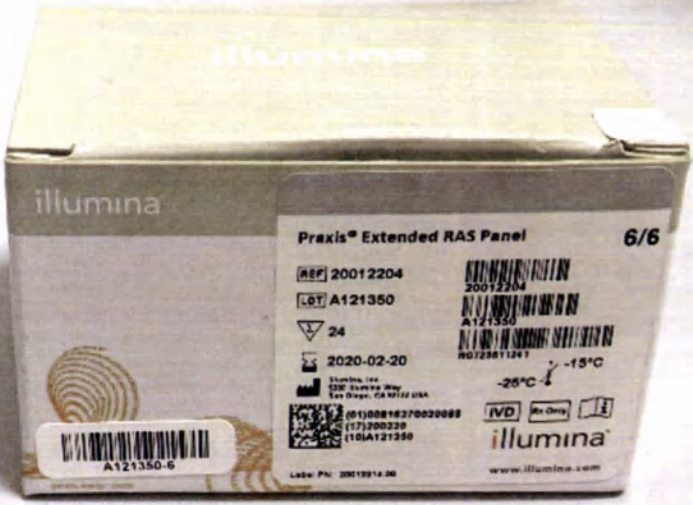
Символ	Интерпретация
	Верх
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Беречь от влаги
	Хранить замороженным
	Класс 9. Прочие опасные вещества и изделия
	Температурный диапазон

Иllumina®	Логотип компании
-----------	------------------

13.2. Вторичная упаковка

Коробка/PN	Фотографии	Масса и размеры коробок Длина (L) Ширина (W) Высота (H) Миллиметры (мм)
Коробка 1 20012195		Масса: 0,315 кг ± 10 % Размеры: L: 150 мм x W: 95 мм x H: 105 мм ± 10%
Коробка 1A 20012196		Масса: 0,116 кг ± 10 % Размеры: H: 90 мм x W: 65 мм x H: 102 мм ± 10%
Коробка 1B 20012197		Масса: 0,095 кг ± 10 % Размеры: L: 90 мм x W: 65 мм x H: 102 мм ± 10%

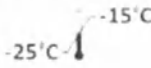
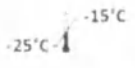
Коробка/PN	Фотографии	Масса и размеры коробок Длина (L) Ширина (W) Высота (H) Миллиметры (мм)
Коробка 2 20012198		Масса: 1,111 кг ± 10 % Размеры: L: 220 мм x W: 80 мм x H: 215 мм ± 10%
Коробка 3 20012199		Масса: 0,479 кг ± 10 % Размеры: L: 268 мм x W: 115 мм H: 107 мм ± 10%
Коробка 3A 20012200		Масса: 0,136 кг ± 10 % Размеры: L: 111 мм x W: 90 мм x H: 100 мм ± 10%
Коробка 3B 20012201		Масса: 0,238 кг ± 10 % Размеры: L: 167 мм x W: 95 мм x H: 11,0 мм ± 10%

Коробка/PN	Фотографии	Масса и размеры коробок Длина (L) Ширина (W) Высота (H) Миллиметры (мм)
Коробка 4 20012202		Масса: 1,320 кг ± 10 % Размеры: L: 155 мм x W: 80 мм x H: 180 мм ± 10%
Коробка 5 20012203		Масса: 0,309 кг ± 10 % Размеры: L: 159 мм x W: 115 мм x H: 134 мм ± 10%
Коробка 6 20012204		Масса: 0,075 кг ± 10 % Размеры: H: 90 мм x W: 55 мм x H: 55 мм ± 10%

13.3. Маркировка вторичной упаковки

Маркировка на упаковке изделия Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel показана на **рисунке: Маркировка изделия Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel**

Рисунок: Маркировка изделия Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel - Маркировка на вторичной (наружной) упаковке

Вторичная упаковка	
Коробка 1 — PN 20012195, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 1/6	
Маркировка упаковки	
Praxis® Extended RAS Panel 1/6	
REF 20012195 LOT 1234556  24  2016-04-26  illumina inc. 4200 Illumina Way San Diego, CA 92122, USA  JO19081627002908B 171160426 1101234556 Label PN: 20012205.00	 20012195  1234556  RGTJ113940  IVD Rx Only  illumina www.illumina.com
Praxis® Extended RAS Panel 1/6	
REF 20012195 LOT 1234556  2016-04-26	 illumina
Макет с названиями компонентов	

Praxis® Extended RAS Panel

1/6

Hybridization Buffer	1 x 4.32 ml
Extension-Ligation Mix	1 x 4.8 ml
PCR Master Mix	1 x 2.8 ml
PCR Polymerase	1 x 56 ul
Index Primers A(A501)-H(A508)	1 x 192 ul
Index Primers 1(A701)-12(A712)	1 x 128 ul
Library Normalization Diluent	1 x 4.6 ml
Library Dilution Buffer	2 x 4.5 ml
PhiX Internal Control	1 x 10 ul

illumina

Label PN: 20012215.00

www.illumina.com

Коробка 1A – PN 20012196, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 1A

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

1A

Pre-AMP

REF 20012196



20012196

LOT 1234556



1234556

24



RGT3113958

2016-04-26

illumina, Inc.
5200 Illumina Way,
San Diego, CA 92122, USA

(01)00816270020088
(17)160426
(10)1234556

-25°C -15°C

IVD

Rx Only

i

illumina

www.illumina.com

Label PN: 20012206.00

Praxis® Extended RAS Panel

1A

REF 20012196

LOT 1234556

2016-04-26

-25°C -15°C

illumina

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

1A

Hybridization Buffer	1 x 4.32 ml
Extension-Ligation Mix	1 x 4.8 ml
PCR Polymerase	1 x 56 ul
PCR Master Mix	1 x 2.8 ml
Index Primers A(A501)-H(A508)	1 x 192 ul
Index Primers 1(A701)-12(A712)	1 x 128 ul

illumina™

Label PN: 20012216.00

www.illumina.com

Маркировка с предупреждением об опасности

DX OHS1

(Contains Formamide, Sodium Chloride)



May damage fertility.
May damage unborn child.
Causes serious eye irritation.

DANGER

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Use personal protective equipment as required. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves and eye/face protection.

IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

www.illumina.com
1-800-809-4566

Label PN: 15041619.A



Part Number: PN 15041619

Revision: A

Item Description: LBL,Hazard_1.34x1.34
_DX#-OHS1

PMS Color: PMS 6C (Black)
PMS 179C (Red)

Date: 03.06.2013

Designer: Brandy Schmidt

illumina

Коробка IB – PN 20012197, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 1B

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

1B

Post-AMP

REF 20012197



20012197

LOT 1234556



1234556

Σ 24



RG73113961

2016-04-26



illumina, inc.
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, USA



(01)00816270020088
(17)160426
(10)1234556

-25°C -15°C

IVD

Rx Only



illumina

www.illumina.com

Label PN 20012207 00

Praxis® Extended RAS Panel

1B

REF 20012197

LOT 1234556

2016-04-26



-25°C -15°C

illumina

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

1B

Library Normalization Diluent 1 x 4.6 ml

Library Dilution Buffer 2 x 4.6 ml

PhiX Internal Control 1 x 10 ul

illumina

Label PN: 20012217.00

www.illumina.com

Маркировка с предупреждением об опасности

DX LNA1

(Contains Formaldehyde, Sodium Chloride)



May damage fertility.
May damage unborn child.
Causes serious eye irritation.

DANGER

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Use personal protective equipment as required. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves and eye/face protection.

If exposed or concerned: Get medical advice/attention.
If IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

www.illumina.com
1-800-805-4566

Label PN: 15041618_A



Part Number: PN 15041618

Revision: A

Item Description: LBL,Hazard_1.34x1.34
_DX#-LNA1

PMS Color: PMS 6C (Black)
PMS 179C (Red)

Date: 03.06.2013

Designer: Brandy Schmidt

illumina

Коробка 2 – PN 20012198, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 2/6

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

2/6

REF 20012198



LOT 1234556



24



2016-04-26

RGT3113941

illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92121 USA

-25°C -15°C

(01)00816270020088
(17)160426
(10)1234556

IVD

Rx Only



Label PN 20012208.00

illumina
www.illumina.com

Praxis® Extended RAS Panel

2/6

REF 20012198

-25°C -15°C

LOT 1234556

2016-04-26

illumina

Маркировка компонента

Praxis® Extended RAS Panel

2/6

MiSeqDx® SBS Cartridge v3 2 x 1

Коробка 3 – PN 20012199, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 3/6

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

3/6

REF 20012199



LOT 1234556



24



2016-04-26

illumina
6200 Illumina Way
San Diego, CA 92121, USA

2°C - 8°C



IVD

Rx Only



Label PN: 20012209 00

illumina
www.illumina.com

Praxis® Extended RAS Panel

3/6

REF 20012199

2°C - 8°C

LOT 1234556

2016-04-26

illumina

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

3/6

Stringent Wash Buffer	1 x 24 ml
Universal Wash Buffer	1 x 4.8 ml
PCR Clean-Up Beads	1 x 5 ml
Library Normalization Wash	2 x 4.8 ml
Library Beads	1 x 1.2 ml
MiSeqDx® Flow Cell	2 x 1

Label PN: 20012219 00

illumina
www.illumina.com

Коробка 3A – PN 20012200, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 3A

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

3A

Pre-AMP

REF 20012200

LOT 1234556

24

2016-04-26

illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, USA
09100816270020088
171560426
11011234556

Label PN: 20012210.00



2°C 8°C

IVD

Rx Only

i

illumina

www.illumina.com

Praxis® Extended RAS Panel

3A

REF 20012200

LOT 1234556

2016-04-26

2°C 8°C

illumina

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

3A

Universal Wash Buffer 1 x 48 ml

Stringent Wash Buffer 1 x 24 ml

illumina

Label PN: 20012220.00

www.illumina.com

Маркировка с предупреждением об опасности

DX# SW1

(Contains Formamide, Sodium Chloride)



May damage fertility.
May damage unborn child.
Causes serious eye irritation.

DANGER

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Use personal protective equipment as required. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves and eye/face protection.

If exposed or concerned: Get medical advice/attention.
If IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

www.illumina.com
1-800-809-4566

Label PN: 15041620.01



(gray shaded areas
represent varnish
over preprint)

Коробка 3B – PN 20012201, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 3B

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel 3B

Post-AMP

REF 20012201



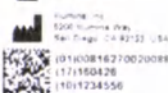
LOT 1234556



24



2016-04-26



2°C 8°C

IVD

Rx On y



illumina
www.illumina.com

Label PN: 20012211.00

Praxis® Extended RAS Panel 3B

REF 20012201

LOT 1234556

2016-04-26

2°C 8°C

illumina

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

3B

PCR Clean-Up Beads	1 x 5 ml
Library Normalization Wash	2 x 4.8 ml
Library Beads	1 x 1.2 ml
MiSeqDx® Flow Cell	2 x 1

illumina

Label PN: 20012221 00

www.illumina.com

Маркировка с предупреждением об опасности

DX LNWI

(Contains Citric Acid Monohydrate, Formamide, Sodium Chloride)



May damage fertility.
May damage unborn child.
Causes serious eye irritation.

DANGER

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Use personal protective equipment as required. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves and eye/face protection.

IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

www.illumina.com
1-800-809-4566

Label PN: 15041617.A



Part Number: PN 15041617

Revision: A

Item Description: LBL_Hazard_1.34x1.34
_DX#-LNWI

PMS Color: PMS 6C (Black)
PMS 179C (Red)

Date: 03.06.2013

Designer: Brandy Schmidt

illumina

Коробка 4 – PN 20012202, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 4/6

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

4/6

REF 20012202



LOT 1234556

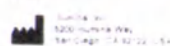


24

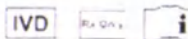
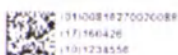


2016-04-26

RG13113947



2°C - 8°C



Label PN: 20012212.00

illumina
www.illumina.com

Praxis® Extended RAS Panel

4/6

REF 20012202

2°C - 8°C

LOT 1234556

2016-04-26

illumina

Маркировка компонента

Praxis® Extended RAS Panel

4/6

MiSeqDx® SBS Solution (PR2)

2 x 500 ml

Label PN: 20012222.00

illumina
www.illumina.com

Коробка 5 – PN 20012203, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 5/6

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

5/6

REF 20012203
 LOT 1234556
 24
 2016-04-26
 Illumina Inc.
 4200 Illumina Way
 San Diego, CA 92122 USA
 01400816270020088
 17180426
 1011234556
 IVD
 Rx On y
 15°C - 30°C
 Label PN 20012213 00
 illumina
 www.illumina.com

Praxis® Extended RAS Panel

5/6

REF 20012203
 LOT 1234556
 2016-04-26
 15°C - 30°C
 illumina
 www.illumina.com

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

5/6

Elution Buffer	1 x 4.8 ml
Library Storage Buffer	1 x 3.5 ml
TruSeq® Custom Amplicon Dx Filter Plate	2 x 1

Label PN 20012223 00

illumina
 www.illumina.com

Коробка 6 – PN 20012204, Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel – 6/6

Маркировка упаковки

Praxis® Extended RAS Panel

6/6

REF 20012204

LOT 1234556

24

2016-04-26

illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122 USA



(01)00816270020088
(17)160426
(10)1234556



20012204



1234556



RG13113953

-25°C -15°C

IVD

Rx Only



illumina

Label PN: 20012214.00

www.illumina.com

Маркировка компонентов

Praxis® Extended RAS Panel

6/6

QC Primers 4 x 75 ul

Oligo Pool A 1 x 150 ul

Oligo Pool B 1 x 150 ul

Panel Control 1 x 8 ul

QC Template 1 x 220 ul

qPCR Master Mix 2 x 1 ml

illumina

Label PN: 20012224.00

www.illumina.com

13.5. Примеры дополнительной маркировки на русском языке:

Коробка 1

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки в составе:

Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 1:

Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 1A:

Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer) – 1 пробирка (4, 32 мл/пробирка).

Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix) – 1 пробирка (4,8 мл/пробирка).

Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508)) – 1 пробирка для каждого праймера (192 мкл/пробирка).

Праймеры индексированные 1 (A701) -12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712)) - 1 пробирка для каждого праймера (128 мкл/пробирка).

ПЦР полимеразы (PCR Polymerase) – 1 пробирка (56 мкл/пробирка).

Смесь для ПЦР (PCR Master Mix) – 1 пробирка (2,8 мл/пробирка).

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 1B:

Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent) – 1 пробирка (4,6 мл/пробирка).

Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) – 2 пробирки (4,5 мл/пробирка).

Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control) – 1 пробирка (10 мкл/пробирка).

Регистрационное удостоверение

№ _____ от _____ г.

Условия хранения, номер партии, срок годности и графические символы см. на оригинальной упаковке.

Только для диагностики ин витро.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

* Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя

Коробка 2

Набор реагентов PraxisTM Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки в составе:

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 2:

Картридж MiSeqTM Dx SBS v3 (MiSeqTM Dx SBS Cartridge v3) – 2 картриджа

Регистрационное удостоверение

№ _____ от _____ г.

Условия хранения, номер партии, срок годности и графические символы см. на оригинальной упаковке.

Только для диагностики ин витро.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

** Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя*

Коробка 3

Набор реагентов PraxisTM Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки в составе:

Реагенты для пре- и пост- амплификации, коробка 3:

Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 3А:

Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer) – 1 флакон (24 мл/флакон).

Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer) – 1 пробирка (4,8 мл/пробирка).

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 3В:

Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads) – 1 пробирка (5 мл/пробирка).

Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash) – 2 пробирки (4,8 мл/пробирка).

Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) – 1 пробирка (1,2 мл/пробирка).

Ячейка проточная MiSeqTM Dx (MiSeqTM Dx Flow Cell) – 2 резервуара (1 ячейка на резервуар).

Регистрационное удостоверение

№ _____ от _____ г.

Условия хранения, номер партии, срок годности и графические символы см. на оригинальной упаковке.

Только для диагностики ин витро.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

** Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя*

Коробка 4

Набор реагентов PraxisTM Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового

поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки в составе:

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 4:

Буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2) – 2 флакона (500 мл/флакон).

Регистрационное удостоверение

№ _____ от _____ г.

Условия хранения, номер партии, срок годности и графические символы см. на оригинальной упаковке.

Только для диагностики ин витро.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

** Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя*

Коробка 5:

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки в составе:

Реагенты для пре- и пост-амплификации, коробка 5:

Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 5:

Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate) – 2 шт.

Реагенты для пост-амплификации (Post-Amp Reagents), коробка 5:

Буфер для элюции (Elution Buffer) – 1 пробирка (4,8 мл/пробирка).

Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer) – 1 пробирка (3,5 мл/пробирка).

Регистрационное удостоверение

№ _____ от _____ г.

Условия хранения, номер партии, срок годности и графические символы см. на оригинальной упаковке.

Только для диагностики ин витро.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

** Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя*

Коробка 6

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (KRAS (экзоны 2, 3 и 4) и NRAS (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине, и заключенных в парафиновые блоки в составе:

Реагенты для пре-амплификации (Pre-Amp Reagents), коробка 6:

Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS) – 1 пробирка (150 мкл/пробирка).

Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS) – 1 пробирка (150 мкл/пробирка).

Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers) – 4 пробирки (75 мкл/пробирка).

ДНК контрольная для проверки качества (QC Template) – 1 пробирка (220 мкл/пробирка).

Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix) – 2 пробирки (1 мл/пробирка).
Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS) – 1 пробирка (8 мкл/пробирка).

Регистрационное удостоверение

№ _____ от _____ г.

Условия хранения, номер партии, срок годности и графические символы см. на оригинальной упаковке.

Только для диагностики *in vitro*.

Для профессионального применения.

Производитель:

«Иллюмина, Инк.», США, (Illumina, Inc.)

5200, Иллюмина Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США (5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Уполномоченный представитель производителя:

ООО «Р-Фарм Интернешнл»

Россия, 123154, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корпус 1, этаж 1, помещение V, комната 9

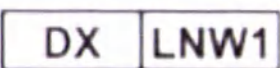
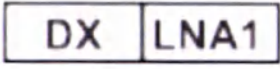
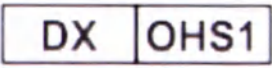
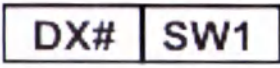
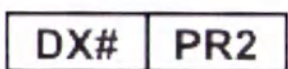
Телефон: +7 (495) 956-79-37, Факс: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

* Окончательная версия маркировки может быть изменена по решению производителя

3.6. Значение символов

Символ	Определение
	Обратитесь к инструкции по применению
	Производитель
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> -количества тестов
	Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон
	Использовать до/дата истечения срока годности
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер партии
	Номер по каталогу
	Серийный номер
Label PN	Номер компонента
	Обозначение ЕС
Illumina®	Логотип компании
	Код QR

	Штрихкод
	Только по назначению
 	ОПАСНОСТЬ Может оказывать токсическое действие на репродуктивную функцию Может оказывать токсическое действие на плод Вызывает выраженное раздражение глаз
	ОПАСНОСТЬ Может оказывать токсическое действие на репродуктивную функцию Может оказывать токсическое действие на плод
	ОСТОРОЖНО! Может вызывать кожные аллергические реакции
	DX: сокращение для «диагностики» LNW1: Раствор промывочный для нормализации библиотек 1 (Library Normalization Wash 1)
	DX: сокращение для «диагностики» LNA1: Дополнительные реагенты для нормализации библиотеки (Additives) 1
	DX: сокращение для «диагностики» OHS1: Раствор 1 для гибридизации олигонуклеотидов
	DX#: сокращение для «диагностики» SW: Буфер для интенсивной отмывки 1 (Stringent Wash 1)
	DX#: сокращение для «диагностики» PR2: Буфер MiSeq TM Dx SBS (MiSeq TM Dx SBS Solution)

В дополнение к маркировке набор реагентов Praxis Extended RAS Panel Kit сопровождается инструкцией по применению, справочным руководством и руководством справочным для программного обеспечения Local Run Manager для модуля анализа PraxisTM Extended RAS Panel. В инструкции по применению набора реагентов Praxis Extended RAS Panel приведены: назначение изделия, описание и разъяснение методики анализа, клинические условия применения, мутации RAS, принцип методики, ограничения методики, компоненты набора, реагенты, условия хранения и использования и т. д.

14. Список материалов животного и (или) человеческого происхождения с информацией об их биологической совместимости и безопасности, выборе источника (донора), отборе проб, обработке, хранении и обращении с такими материалами.

Не применимо. Примечание! ДНК, которая содержится в составе некоторых компонентов, не была выделена из животного или человеческого материала.

15. Ссылки на предыдущие версии медицинского изделия или схожие версии медицинского изделия, находящиеся в обращении, если информация о подобных изделиях или предыдущих версиях медицинского изделия включена в техническую документацию для подтверждения соответствия требованиям безопасности и эффективности

Не применимо.

16. Информация из Государственного реестра лекарственных средств и изделий медицинского назначения, относящаяся к следующим веществам, содержащимся в медицинском изделии

Не применимо.

17. Описание метода стерилизации, валидации методов стерилизации (включая тесты на бионагрузку, пирогенность и остаточные стерилизующий агент) и валидации методов упаковки (если медицинское устройство поставляется в стерильном состоянии).

Набор реагентов Praxis Extended RAS Panel не содержит компонентов, требующих стерилизации.

18. Рабочие характеристики

Характеристики	Значение
Аналитическая чувствительность (Диапазон ДНК) (<i>Analytical sensitivity (DNA Input Range)</i>)	1200–25 нг
Аналитическая чувствительность (Диапазон dCq) (<i>Analytical sensitivity (Range of dCq)</i>)	-0,5–5
Аналитическая чувствительность (Предел обнаружения [LoD]) (<i>Analytical sensitivity (Limit of Detection [LoD])</i>)	5 %
Аналитическая чувствительность (Предел холостой пробы [LoB]) (<i>Analytical sensitivity (Limit of Blank [LoB])**</i>)	2,6 %
Точность (<i>Accuracy</i>)	Процент положительного соответствия (Positive Percent Agreement (PPA)) - не менее 98,7 % Процент отрицательного соответствия (Negative Percent Agreement (NPA)) - не менее 97,6 %
Воспроизводимость (<i>Reproducibility</i>)	Процент верных определений (Percent Correct Cal (PCC)) уровня мутаций для всех образцов с мутациями должен составлять не менее 99,6% (905/909)
Прецизионность (<i>Precesion</i>)	Для всех партий во все дни должно составлять не менее 99,7% (359/360)

Характеристики	Значение	
Аналитическая специфичность (интерферирующие вещества) (Analytical Specificity (Interfering Substances))	Экзогенные вещества	
	Интерферирующее вещество	Фактическое количество [мкл/25 мкл элюата]
	Раствор для депарафинизации	$1,69 \times 10^{-04}$
	Парафиновый воск (в ксилоле)	$2,50 \times 10^{-05}$
	Ксилол	$2,50 \times 10^{-05}$
	Этанол	$1,69 \times 10^{-04}$
	Протеиназа К	$3,30 \times 10^{-06}$
	Промывочный раствор, N	$6,25 \times 10^{-01}$
	1-Кратный промывочный раствор, P	$6,25 \times 10^{-01}$
	Промывочный буфер AW1	$6,25 \times 10^{-02}$
	Промывочный буфер AW2	$6,25 \times 10^{-01}$
	Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при максимальных концентрациях, использование которых ожидается в процессе выделения геномной ДНК (гДНК) из ткани FFPE, не влияет на выполнение анализа с помощью Набора реагентов Praxis™ Extended RAS .	
	Эндогенные вещества (гемоглобин) В присутствии или в отсутствие 2 мг/мл гемоглобина «высокой концентрации» в соответствии с определением Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI; Clinical and Laboratory Standards Institute). Исследованная концентрация гемоглобина не влияет на выполнение исследования с помощью Набора реагентов Praxis™ Extended RAS.	
	Некротическая ткань Набор реагентов Praxis™ Extended RAS соответствует характеристикам выполнения, если ткань содержит 10–80% некроза.	
Более подробную информацию См. ниже в разделе «Интерферирующие субстанции»		

**Значения PI округлены до целых чисел.

Более подробную информацию см. в Инструкции по применению, раздел Характеристики производительности и Отчеты представлены в Приложении 3

Интерферирующие вещества

Интерферирующие вещества исследовали для оценки влияния потенциальных интерферирующих веществ на рабочие характеристики Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel. Рабочие

характеристики оценивали в присутствии экзогенных (парафин, ксилол, этанол и протеиназа К, растворы для экстракции) и эндогенных субстанций (некротизированная ткань и гемоглобин).

Экзогенные вещества

Исследовали экзогенные вещества, растворы, обычно используемые при экстракции ДНК, которые перечислены с указанием количества в таблице ниже.

Пятнадцать (15) образцов FFPE тканей колоректального рака исследовали с интерферирующими веществами и сравнивали с результатами контрольных образцов без добавленных веществ. Эти образцы представляли собой образцы дикого типа, не содержащие мутаций из перечня для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (5/15 образцов), а также образцы, содержащие распространенные мутации из перечня для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (10/15 образцов). Секвенирование образцов проводили при максимальном уровне мультиплексирования, по 10 образцов плюс контроли на прогон.

Исследуемое вещество

Интерферирующее вещество	Фактическое количество [мкл/25 мкл элюата]
Раствор для депарафинизации	$1,69 \times 10^{-4}$
Парафин (в ксилоле)	$2,50 \times 10^{-05}$
Ксилол	$2,50 \times 10^{-05}$
Этанол	$1,69 \times 10^{-4}$
Протеиназа К	$3,30 \times 10^{-06}$
Промывочный раствор, N	$6,25 \times 10^{-01}$
1X промывочный раствор, P	$6,25 \times 10^{-01}$
Промывочный буфер AW1	$6,25 \times 10^{-02}$
Промывочный буфер AW2	$6,25 \times 10^{-01}$

Для всех исследованных экзогенных веществ все 15 образцов соответствовали требованиям оценки контроля качества образцов (15/15, 100 % уровень прохождения КК), и после приготовления библиотеки и секвенирования были получены валидные результаты (15/15, 100 % уровень первого прохождения).

ОРА, РРА и НРА рассчитаны для каждой мутации с учетом существующих 56 мутаций на один образец. Для всех 15 образцов и всех 9 экзогенных веществ было показано соответствие с результатами контрольных образцов с мутациями и без. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты отсутствовали. Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при максимальных возможных концентрациях в процессе выделения геномной ДНК (гДНК) из образцов FFPE, не влияет на выполнение и результаты анализа с помощью Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Эндогенные вещества (гемоглобин)

Пятнадцать (15) образцов FFPE CRC исследовали в присутствии или в отсутствие 2 мг/мл гемоглобина («высокая концентрация» в соответствии с определением Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI; Clinical и Laboratory Standards Institute)). Эти образцы представляли собой образцы дикого типа, не содержащие мутаций из перечня для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (5/15

образцов), а также образцы, содержащие распространенные мутации из перечня для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (10/15 образцов). Секвенирование образцов проводили при максимальном уровне мультиплексирования, по 10 образцов плюс контроли на прогон. Все 15 образцов соответствовали требованиям оценки контроля качества образцов (15/15, 100 % уровень прохождения КК), и после приготовления библиотеки и секвенирования были получены действительные результаты (15/15, 100 % уровень первого прохождения). Для всех 15 образцов было показано согласование с результатами контрольных образцов с мутациями и без. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты отсутствовали. Присутствие гемоглобина в исследованной концентрации не повлияло на рабочие характеристики Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel.

Некротизированная ткань

Для оценки образцов эндогенной некротической ткани использовали пятнадцать (15) FFPE образцов CRC дикого типа, не содержащие мутаций из перечня для набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (10/15 образцов), а также образцы, содержащие распространенные мутации из перечня набора реагентов Praxis Extended RAS Panel (5/15 образцов) и 10–80 % некротизированных тканей согласно патоморфологическому отчету. Секвенирование образцов проводили при максимальном уровне мультиплексирования, по 10 образцов плюс контроли на прогон. Для 14/15 образцов были получены валидные результаты после приготовления библиотеки и секвенирования (93,3% уровень первого прохождения образцов). Общий процент соответствия относительно метода секвенирования по Сэнгеру составлял 99,9% (783/784). PPA составлял 100% (4/4), а NPA составлял 99,9% (779/780). Один (1) выявленный ложноположительный результат, вероятно, был связан с тем, что частота мутации была ниже предела обнаружения для секвенирования по Сэнгеру. Таким образом, при анализе образцов ткани содержащей 10–80% некроза рабочие характеристики Набора реагентов Praxis Extended RAS Panel соответствуют установленным.

Показатели качества прогона должны соответствовать следующим критериям:

Показатель качества прогона	Значение
(M)Reads PF	не менее 7.78
Q30+(R1)	не менее 81.9
Q30+(R2)	не менее 77.7
%Registered	не менее 98.8
Control	N/A
Blank	N/A

(M)Reads PF – число прочтений, полученных после фильтрации данных чтений по качеству, в миллионах.

Q30+(R1), Q30+(R2) – процент оснований ДНК для прямого (R1) и обратного (R2) прочтения фрагмента ДНК, для которых оценка Q-индекса качества равна и выше 30.

%Registered – процент чтений, успешно картированных на референсный участок ДНК генов *KRAS* и *NRAS*, на определение мутаций, на выявление которых направлен набор реагентов.

Control – проверка соответствия результатов, полученных для внутреннего положительного контрольного образца, ожидаемым. В случае, когда обнаружено несоответствие, указывается обнаруженный результат (и FAIL в графе Status).

Blank – проверка соответствия результатов, полученных для внутреннего отрицательного контрольного образца, ожидаемым. В случае, когда обнаружено несоответствие (обнаружена какая-либо мутация), указывается обнаруженный результат (и FAIL в графе Status).

N/A – не применимо.

19. Описание методов измерений, метрологическая прослеживаемость калибровочных значений и контрольных материалов

Не применимо.

20. Информация о стабильности медицинского изделия, подтверждающая указанный срок службы, а также устойчивость при эксплуатации и транспортировке

Срок годности

Срок годности - реагенты стабильны до указанного на упаковке срока, дату срока годности см. на упаковке. Не используйте реагенты после истечения срока годности.

Стабильность в открытой пробирке

Коробка	Число циклов замораживания/оттаивания/использования	Температура	Относительная влажность	Давление
Коробка 1А	5 циклов замораживания/оттаивания до истечения срока годности *за исключением праймеров индексированных, предназначенных для однократного использования	от -25°C до -15°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление
Коробка 1В	5 циклов замораживания/оттаивания до истечения срока годности	от -25°C до -15°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление
Коробка 2	Не замораживайте картридж повторно после его оттаивания. Картридж можно хранить до 6 часов при температуре от 2 °C до 8 °C. Картридж предназначен для однократного использования.	от -25°C до -15°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление
Коробка 3А	Для 2-кратного использования В промежутке между использованиями реагенты следует хранить закрытыми при соответствующей температуре хранения.	от 2°C до 8°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление
Коробка 3В	Для 2-кратного использования В промежутке между использованиями реагенты следует хранить закрытыми при соответствующей температуре хранения. *за исключением ячейки проточной MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx flow cell),	от 2°C до 8°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление

Коробка	Число циклов замораживания/оттаивания/использования	Температура	Относительная влажность	Давление
	предназначенной для однократного использования.			
Коробка 4	Следует использовать сразу после вскрытия, поскольку реагент предназначен для однократного использования.	от 2°C до 8°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление
Коробка 5	Для 2-кратного использования В промежутке между использованиями реагенты следует хранить закрытыми при соответствующей температуре хранения. *за исключением планшета фильтровального, предназначенного для однократного использования.	от 15°C до 30°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление
Коробка 6	5 циклов замораживания/оттаивания до истечения срока годности	от -25°C до -15°C	10–80 % без конденсата	атмосферное давление

Хранение и обращение

На коробке каждого компонента набора реагентов Praxis Extended RAS Panel напечатан срок годности. Реагенты обеспечивают надлежащее качество 2 отдельных аналитических серий для 12 образцов/24 библиотек (включая контроли) в каждой. После использования пробирки с реагентами следует закрыть крышками и вернуть в исходные условия хранения, если реагенты не предназначены для однократного использования.

Следующие реагенты поставляются в замороженном виде и стабильны при хранении при температуре -25 °C до -15 °C до указанной даты:

- Пул праймеров A (Oligo Pool A – Extended RAS)
- Пул праймеров B (Oligo Pool B – Extended RAS)
- Буфер для гибридизации (Hybridization Buffer)
- Смесь для удлинения-лигирования (Extension-Ligation Mix)
- Праймеры индексированные A (A501) – H (A508) (Index Primers A (A501) – H (A508))
- Праймеры индексированные 1 (A701) – 12 (A712) (Index Primers 1 (A701) - 12 (A712))
- ПЦР полимеразы (PCR Polymerase)
- Смесь для ПЦР (PCR Master Mix)
- Разбавитель для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent)
- Буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer)
- Контроль внутренний PhiX (PhiX Internal Control)
- Картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3)
- Праймеры контрольные для проверки качества (QC Primers)
- ДНК контрольная для проверки качества (QC Template)
- Библиотека контрольная RAS (Panel Control – Extended RAS)
- Смесь для количественной ПЦР (qPCR Master Mix)

За исключением картриджа с реагентами, все перечисленные выше реагенты стабильны максимум при 5 циклах замораживания/оттаивания до истечения срока годности.

Праймеры индексированные и Картридж MiSeq™Dx (MiSeq™Dx Cartridge) предназначены только для однократного применения.

ВНИМАНИЕ!

Не храните реагенты вне морозильных камер или в дверных отсеках.

Не замораживайте картридж с реагентами после оттаивания. Картридж можно хранить при температуре от 2°C до 8°C до 6 часов.

Следующие реагенты поставляются в охлажденном виде и стабильны при хранении при температуре 2 °C до 8 °C до указанной даты:

- Буфер для интенсивной отмывки (Stringent Wash Buffer)
- Буфер универсальный, промывочный (Universal Wash Buffer)
- Микрочастицы для очистки ПЦР-продуктов (PCR Clean-Up Beads)
- Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)
- Раствор промывочный для нормализации библиотек (Library Normalization Wash)
- Буфер MiSeq™Dx SBS (PR2) (MiSeq™Dx SBS Solution (PR2))
- Ячейка проточная MiSeq™Dx (MiSeq™Dx Flow Cell)
- Буфер MiSeq™Dx SBS (PR2) (MiSeq™Dx SBS Solution (PR2)) и Ячейка проточная MiSeq™Dx (MiSeq™Dx Flow Cell) предназначены для однократного использования.

Следующие реагенты поставляются при температуре окружающей среды и стабильны при хранении при комнатной температуре (15 °C – 30 °C) до указанной даты:

- Буфер для элюции (Elution Buffer)
- Планшет фильтровальный TruSeq™ Custom Amplicon Dx (TruSeq™ Custom Amplicon Dx Filter Plate)
- Буфер для хранения библиотек (Library Storage Buffer)

Планшет фильтровальный предназначен только для однократного использования.

Изменение внешнего вида предоставляемых реагентов может указывать на деградацию материалов. При возникновении изменений внешнего вида (например, очевидных изменений цвета реагента или помутнения, которое появляется при микробном заражении), не используйте реагенты.

Буфер для гибридизации, буфер для интенсивной промывки и разбавитель для разведения библиотек при нормализации могут содержать видимые частицы или кристаллы. Перед использованием реагенты необходимо тщательно перемешать, а затем визуально убедиться в отсутствии преципитатов.

Лучшим способом подготовки Микрочастиц для библиотеки (Library Beads) и очистки продуктов ПЦР является следующий:

- Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) нельзя замораживать.
- Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) выдерживают до достижения комнатной температуры.
- Непосредственно перед использованием Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) перемешивают на вортексе до получения суспензии однородной консистенции и цвета.
- После добавления Микрочастицы для библиотеки (Library Beads), тщательно перемешивают образец, 10-кратно пипетируя вверх-вниз.
- Для тщательного перемешивания можно также использовать шейкер.

- Инкубируют смесь Микрочастицы для библиотеки (Library Beads)/образец при комнатной температуре в течение указанного времени.
- Следуйте инструкциям по применению магнитного штатива. Перед тем, как набрать раствор в пипетку, дождитесь осаждения микрочастиц и прозрачности раствора.

Осторожно удалите супернатант, держа планшет на магнитном штативе и следя за тем, чтобы не задеть осевшие микрочастицы.

Планшет для ПЦР-амплификации можно оставить в термоциклере на ночь или хранить при температуре от 2°C до 8°C до 2 дней. Перед хранением при температуре от 2°C до 8°C планшет следует заклеить.

ВНИМАНИЕ!

Не замораживать Микрочастицы для библиотеки (Library Beads) и их смесь с разбавителем для разведения библиотек при нормализации (Library Normalization Diluent), если они не были использованы сразу.

Разведенную библиотеку ампликонов можно хранить при температуре от -25°C до -15°C в течение 30 ней.

Условия транспортировки

Медицинское изделие транспортируют всеми видами транспорта, в крытых транспортных средствах, при температуре хранения, указанной в инструкции по применению, в соответствии с требованиями страны и правилами перевозки грузов, действующими для каждого вида транспорта.

Стабильность при транспортировке - в течение 72 часов для реагентов с температурой хранения 2 °C – 8 °C и -25 °C – -15 °C.

21. Процедура утилизации или уничтожения медицинского изделия

Отходы должны быть утилизированы как эпидемиологически опасные (класс В) в соответствии с установленными лабораторными правилами, а также местными и государственными нормативами.

22. Экологические требования к использованию медицинского изделия

то медицинское изделие не наносит вреда окружающей среде при правильном использовании, транспортировке, хранении и утилизации.

23. Требования к техническому обслуживанию и ремонту медицинского изделия

Не применимо.

24. Гарантийные обязательства

Изготовитель гарантирует стабильность медицинского изделия до истечения срока годности при условиях транспортировки, хранения и использования, указанных в инструкции.

Изготовитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании медицинского изделия по назначению на условиях, предусмотренных изготовителем.

25. Перечень национальных и международных правил/стандартов, которым соответствует медицинский прибор

Перечень стандартов

Стандарт	Описание
ASTM D 4728-06	Стандартный метод испытаний контейнеров для перевозки на случайные вибрации.
ASTM D 5276-98	Стандартный метод испытаний контейнеров с содержимым на свободное падение.
ASTM D 999-08	Стандартный метод испытаний контейнеров для перевозки на вибрации.
BS EN 13640:2002	Исследование стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
CLSI C53-A	Характеризация и квалификация заменяемых контрольных материалов для лабораторной медицины, принятое руководство
Стандарт CLSI EP12-A2	Протокол пользователя для оценки количественных рабочих характеристик анализа, принятое руководство – второе издание.
Стандарт CLSI EP17-A2	Протоколы для определения пределов обнаружению и пределов количественного определения, принятое руководство.
Стандарт CLSI EP25	Исследование стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
EN 13640:2002	Исследование стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
EN 15223-1:2016	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ISO 13485:2012	«Изделия медицинские. Системы менеджмента качества».
ISO 14971:2012	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
ISTA 3A	Продукция в упаковке массой не более 150 фунтов (68 кг) для системы доставки Parcel Delivery.
ISTA 7D	Транспортные контейнеры с термоконтролем для системы доставки Parcel Delivery.

26. Рекламации

В случае возникновения вопросов, связанных с гарантийными обязательствами производителя, следует обращаться к юридическому представителю производителя в Российской Федерации:

ООО «Р-Фарм Интернешнл» (R-Pharm International LLC)

123154, Москва, ул. Берзарина, д. 19 корп. 1, 1 этаж, помещение V, комната 9

Тел: +7 (495) 956-79-37, Факс.: +7 (495) 956-79-38

e-mail: info@rpharm.ru

www.r-pharm.com

/Логотип/: Иллюмина® (Illumina®)

Набор реагентов Praxis™ Extended RAS Panel для качественного определения статуса специфических мутаций генов RAS (*KRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4)) методом секвенирования нового поколения в пробе геномной ДНК человека, выделенной из образцов тканей колоректального рака, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки

Дополнение к инструкции по применению

Производитель:

Компания «Иллюмина Инк» (Illumina, Inc)

Адрес:

5200, Иллюмина-Уэй, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92122, США
(5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, USA)

Утверждено

от имени компании «Иллюмина Инк»

/подпись/

Дата

16 июня 2020 года

Аурелия Браунридж (Aurelia Brownridge)

Старший специалист по вопросам
нормативно-правового регулирования
Компания «Иллюмина Инк»

/Печать/: МЭРИ АГОСТИНО (MARY AGOSTINO)

Потариус, штат Калифорния

Округ Сан-Диего

Лицензия № 2282380

Срок действия моих полномочий истекает 23 марта 2023 года

УДОСТОВЕРЕНИЕ

Нотариус или другое должностное лицо, заполняющее настоящее свидетельство, проверяет только личность лица, подписавшего документ, к которому прилагается настоящее свидетельство, а не достоверность, точность или действительность указанного документа.

Штат Калифорния

Округ Сан-Диего)

16 июня 2020 года ко мне, Мэри Агостино, нотариусу,

(укажите имя, фамилию и должность должностного лица)

лично обратилась Аурелия Браунридж,
которая предоставила мне убедительные доказательства, что он/она/они является лицом,
именем которого подписан документ, и подтвердила, что он/она/они обладает
полномочиями выступать в указанном качестве, а также что, скрепляя документ своей
подписью, лицо или организация, от имени которой действовало указанное лицо,
подтверждает его оформление.

Я подтверждаю под страхом НАКАЗАНИЯ ЗА ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ЗАВЕДОМО
ЛОЖНЫХ СВЕДЕНИЙ в соответствии с законодательством штата Калифорния, что
вышеизложенный пункт является верным и точным.

ЗАСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНО моей подписью и официальной печатью.

*/Штамп/: МЭРИ АГОСТИНО
Нотариус, штат Калифорния
Округ Сан-Диего
Лицензия № 2282380
Срок действия моих
полномочий истекает
23 марта 2023 года*

Подпись _____ /подпись/ (Печать)

Перевод данного текста выполнен переводчиком Алексеевым Алексеем Александровичем.

А.А.А.

Российская Федерация

Город Москва.

Второго июля две тысячи двадцатого года.

Я, Прокошенкова Елена Евгеньевна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Алексеева Алексея Александровича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 21/86-н/77-2020-

16-1802

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 300 руб. 00 коп.

Е.Е. Прокошенкова

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 71 лист (

Е.Е. Прокошенкова

