



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО «Ферст Генетикс»

Н.А. Кузнецов

«25» февраля 2022г.

НАБОР РЕАГЕНТОВ «ОНКОФОКУС» ДЛЯ
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО
ПОКОЛЕНИЯ (NGS) ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С
ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА, НА СИСТЕМЕ
«F-GENETICS»

Инструкция по применению версии 25.02.2022

Лист утверждения

Подпись и дата	СОГЛАСОВАНО Зам. заведующего лабораторией АО «Ферст Генетикс»  Е.А. Ковтунов «25» февраля 2022г.				
Инв. № дубл.					
Взамен инв. №					
Подпись и дата					
	Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата

Набор реагентов **«ОнкоФокус»**
для высокопроизводительного секвенирования
следующего поколения (NGS) генов,
ассоциированных с возникновением опухолей
человека, на системе «F-Genetics»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



АО "Ферст Генетикс", 121205, Россия, г. Москва,
территория инновационного центра "Сколково",
Большой бульвар, дом 42, строение 1,
помещение 619
тел. (499) 673-02-88, e-mail: info@f-genetics.com

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	4
1.1. НАИМЕНОВАНИЕ И СОСТАВ	4
1.2. НАЗНАЧЕНИЕ	7
1.3. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОТРЕБИТЕЛЬ	7
1.4. ОПИСАНИЕ ЦЕЛЕВОГО АНАЛИТА	8
1.5. УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ	8
1.6. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	8
1.7. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	8
1.8. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	8
1.9. ВОЗМОЖНЫЕ ПОБОЧНЫЕ ДЕЙСТВИЯ	8
1.10. РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	8
1.11. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	8
1.11.1. Обоснованность метода	8
1.11.2. Принцип метода	12
1.11.3. Клиническая значимость исследования	15
1.11.4. Функциональные характеристики набора	21
1.11.4.1. Типы выявляемых отклонений от референсной последовательности	21
1.11.4.2. Аналитические характеристики набора	22
1.11.4.2.1. Предел обнаружения и аналитическая чувствительность	22
1.11.4.2.2. Входное количество ткани и содержание опухоли в ткани	23
1.11.4.2.3. Аналитическая специфичность	24
1.11.4.2.4. Повторяемость и воспроизводимость	28
1.11.4.3. Процент позитивного согласия и процент негативного согласия набора	29
1.11.4.4. Биоинформатические параметры набора	31
1.11.4.4.1. Длина прочтения и количество прочтений на один образец	31
1.11.4.4.2. Точность прочтения	31
1.11.4.4.3. Процент целевых прочтений	31
1.11.4.4.4. Равномерность покрытия	32
1.11.4.4.5. Средняя глубина покрытия	32
1.11.4.4.6. Медиана абсолютных значений всех парных отклонений (показатель MAPD, Median of the Absolute values of all Pairwise Differences)	32
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	33
2.1. Варианты исполнения, состав и комплектность	33
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	44
3.1. Внутренний контроль качества	44
3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования	44
3.1.2. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации	45
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	45
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	46
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	50
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	52
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
8.1. Последовательное выделение РНК и ДНК	54
8.2. Создание библиотек	63
8.2.1. Ручное создание библиотек (набор реагентов «ОнкоФокус 64»)	63
8.2.2. Автоматическое создание библиотек с помощью станции пробоподготовки (для набора «ОнкоФокус 32 авто»)	80
8.3. Создание Запланированного запуска секвенатора	94
8.4. Запуск станции пробоподготовки для подготовки матрицы	99
8.5. Инициализация секвенатора	116

8.6. Очистка станции пробоподготовки	121
8.7. Анализ результатов секвенирования	126
ДОПОЛНЕНИЕ А Поиск и устранение неисправностей	131
ДОПОЛНЕНИЕ Б Дополнительные процедуры	134
ДОПОЛНЕНИЕ В Создание аккаунта Ion Reporter	136
9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	
137	
10. МАРКИРОВКА	139
11. УПАКОВКА	141
12. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	143
13. БИБЛИОГРАФИЯ	144
14. ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ/ СТАНДАРТОВ	
145	
15. УТИЛИЗАЦИЯ	145
16. ТРЕБОВАНИЯ К ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ	
МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	146

1.ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

1.1. НАИМЕНОВАНИЕ И СОСТАВ

«Набор реагентов «ОнкоФокус» для высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) генов, ассоциированных с возникновением опухолей человека, на системе «F-Genetics» по ТУ 21.20.23-003-03569019-2019, в составе:

I. Набор реагентов, в вариантах исполнения:

1. «ОнкоФокус 64», в составе:

1.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», 3 шт.:

1.1.1. Лизирующий буфер – 1 флакон (16 мл);

1.1.2. Изолирующий реагент –1 флакон (19,2 мл);

1.1.3. Отмывочный концентрат 1 – 1 флакон (60 мл);

1.1.4. Отмывочный концентрат 2/3– 1 флакон (60 мл);

1.1.5. Протеаза – 1 пробирка (160 мкл);

1.1.6. Раствор для элюции –1 флакон (5 мл);

1.1.7. ДНКаза – 1 пробирка (160 мкл);

1.1.8. Буфер для ДНКаз, 10X –1 пробирка (240 мкл);

1.1.9. Фильтрующие картриджи – 2 пакета (2х 20 шт.);

1.1.10. Собирающие пробирки – 2 пакета (2 х40 шт.);

1.1.11. РНКаза А – 1 пробирка (400 мкл).

1.2. Набор реагентов для обратной транскрипции:

1.2.1. Фермент для обратной транскрипции, 10X – 1 пробирка (100 мкл);

1.2.2. Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X – 1 пробирка (200 мкл).

1.3. Набор «ОФ» для ручного создания библиотек, 4шт.:

1.3.1. Панель «ОФ» для создания ДНК-библиотек, 5X – 1 пробирка (64 мкл);

1.3.2. Панель «ОФ» для создания РНК-библиотек, 5X – 1 пробирка (64 мкл);

1.3.3. Набор для создания библиотек, 4 шт.:

1.3.3.1. Фермент для создания библиотек, 5X –1 пробирка (40 мкл);

1.3.3.2. Фермент для частичного расщепления ампликонов – 1 пробирка (16 мкл);

1.3.3.3. Стоп-раствор – 1 пробирка (32 мкл);

1.3.3.4. ДНК-лигаза – 1 пробирка (16 мкл);

1.3.3.5. Набор для ПЦР-обогащения библиотек –1 пробирка (400 мкл);

1.3.3.6. Праймеры для амплификации библиотек – 1 пробирка (16 мкл);

1.3.3.7. Буферный раствор LowTE –1 флакон (6 мл).

1.4. Набор баркодов 1-16:

1.4.1. Адаптер для библиотек – 1 пробирка (320 мкл);

1.4.2. Баркод 1 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.3. Баркод 2 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.4. Баркод 3 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.5. Баркод 4 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.6. Баркод 5 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.7. Баркод 6 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.8. Баркод 7 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.9. Баркод 8 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.10. Баркод 9 – 1 пробирка (20 мкл);

1.4.11. Баркод 10 – 1 пробирка (20 мкл);

Версия 25.02.2022

- 1.4.12. Баркод 11 – 1 пробирка (20 мкл);
- 1.4.13. Баркод 12 – 1 пробирка (20 мкл);
- 1.4.14. Баркод 13 – 1 пробирка (20 мкл);
- 1.4.15. Баркод 14 – 1 пробирка (20 мкл);
- 1.4.16. Баркод 15 – 1 пробирка (20 мкл);
- 1.4.17. Баркод 16 – 1 пробирка (20 мкл);
- 1.5. Набор для измерения концентрации библиотек:
- 1.5.1. Мастер-микс для кПЦР, 2X – 2 пробирки (2 x 1,25мл);
- 1.5.2. Панель для измерения концентрации библиотек, 20X – 1 пробирка (250 мкл);
- 1.5.3. Контрольная библиотека для реакции кПЦР – 2 пробирки (2 x 25 мкл).
- 1.6. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке), 2 шт.
- 1.7. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки - 4 шт.:
- 1.7.1. Планшет 96-луночный;
- 1.7.2. Профольгированная крышка;
- 1.7.3. Наконечники одноразовые (96 шт. в штативе);
- 1.7.4. Пробирки (12 шт. в упаковке);
- 1.7.5. Крышка для центрифуг (2 шт.);
- 1.7.6. Штатив с пробирками для модуля обогащения;
- 1.7.7. Адаптер для чипа (2 шт.).
- 1.8. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке).
- 1.9. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке).
- 1.10. Набор растворов «ОФ» для секвенирования:
- 1.10.1. Промывочный раствор «ОФ», бутылка (1,5 л) – 4 шт.;
- 1.10.2. Раствор для очистки «ОФ», бутылка (250 мл) – 1 шт.
- 1.11. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке).

2. «ОнкоФокус 32 авто» в составе:

- 2.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», 2 шт.:
- 2.1.1. Лизирующий буфер – 1 флакон (16 мл);
- 2.1.2. Изолирующий реагент – 1 флакон (19,2 мл);
- 2.1.3. Отмывочный концентрат 1 – 1 флакон (60 мл);
- 2.1.4. Отмывочный концентрат 2/3 – 1 флакон (60 мл);
- 2.1.5. Протеаза – 1 пробирка (160 мкл);
- 2.1.6. Раствор для элюции – 1 флакон (5 мл);
- 2.1.7. ДНКазы – 1 пробирка (160 мкл);
- 2.1.8. Буфер для ДНКаз, 10X – 1 пробирка (240 мкл);
- 2.1.9. Фильтрующие картриджи – 2 пакета (2x 20 шт.);
- 2.1.10. Собирающие пробирки – 2 пакета (2 x 40 шт.);
- 2.1.11. РНКазы А – 1 пробирка (400 мкл).
- 2.2. Набор реагентов для обратной транскрипции:
- 2.2.1. Фермент для обратной транскрипции, 10X – 1 пробирка (100 мкл);
- 2.2.2. Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X – 1 пробирка (200 мкл).
- 2.3. Набор «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек:

- 2.3.1. Панель «ОФ-авто» для создания ДНК-библиотек, 2X – 8 пробирок (8 x 150 мкл);
- 2.3.2. Панель «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X – 8 пробирок (8 x 150 мкл);
- 2.3.3. Набор картриджей «ОФ-авто» с растворами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке), 2 шт.;
- 2.3.4. Набор картриджей «ОФ-авто» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке), 2 шт.;
- 2.3.5. Набор материалов «ОФ-авто» для станции пробоподготовки (4 набора в упаковке), 2 шт.:
- 2.3.5.1. Наконечники одноразовые «ОФ-авто» (96 шт. в штативе);
- 2.3.5.2. Профольгированная крышка;
- 2.3.5.3. Штатив с пробирками для модуля обогащения;
- 2.3.6. Набор баркодов «ОФ-авто» 1-32 (4 планшета в упаковке) – 2 шт.:
- 2.3.6.1. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 1-8;
- 2.3.6.2. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 9-16;
- 2.3.6.3. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 17-24;
- 2.3.6.4. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 25-32.
- 2.4. Набор для измерения концентрации библиотек:
- 2.4.1. Мастер-микс для кПЦР, 2X – 2 пробирки (2 x 1,25мл);
- 2.4.2. Панель для измерения концентрации библиотек, 20X – 1 пробирка (250 мкл);
- 2.4.3. Контрольная библиотека для реакции кПЦР – 2 пробирки (2 x 25 мкл).
- 2.5. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке);
- 2.6. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки, 4 шт.:
- 2.6.1. Планшет 96-луночный;
- 2.6.2. Профольгированная крышка;
- 2.6.3. Наконечники одноразовые (96 шт. в штативе);
- 2.6.4. Пробирки (12 шт. в упаковке);
- 2.6.5. Крышка для центрифуг (2 шт.);
- 2.6.6. Штатив с пробирками для модуля обогащения;
- 2.6.7. Адаптер для чипа (2 шт.).
- 2.7. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке).
- 2.8. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке).
- 2.9. Набор растворов «ОФ» для секвенирования:
- 2.9.1. Промывочный раствор «ОФ», бутыл (1,5 л) – 4 шт.;
- 2.9.2. Раствор для очистки «ОФ», бутыл (250 мл) – 1 шт.
- 2.10. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке).

II. Краткое руководство по применению.

III. Паспорт качества.

Сокращения, используемые в тексте:

SNV	– нуклеотидные замены
InDels (индели)	– инсерции/делеции
CNV	– вариации числа копий генов
Fusion	– химерные транскрипты
qPCR	– количественная ПЦР

«Набор реагентов «ОнкоФокус» для высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) генов, ассоциированных с возникновением опухолей человека, на системе «F-Genetics»» по ТУ 21.20.23-003-03569019-2019, далее по тексту:

- Набор реагентов «ОнкоФокус» для высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) генов, ассоциированных с возникновением опухолей человека, на системе «F-Genetics» *или*
- Набор реагентов «ОнкоФокус» *или*
- Набор реагентов «ОнкоФокус 64» *или*
- Вариант исполнения «ОнкоФокус 64» *или*
- Набор реагентов «ОнкоФокус 32 авто» *или*
- Вариант исполнения «ОнкоФокус 32 авто» *или*
- Набор «ОнкоФокус» *или*
- Набор реагентов *или*
- Набор.

1.2. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) генов, ассоциированных с возникновением опухолей: *ABL1, AKT1, AKT3, ALK, AR, AXL, BRAF, CDK4, CDK6, CCND1, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, MYC, MYCN, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, PPARG, RAF1, RET, ROS1, SMO* на системе «F-Genetics» в образцах опухолей человека, фиксированных в формалине, залитых в парафиновые блоки (FFPE), и цитологических опухолевых препаратах. Полученные результаты используются для определения нуклеотидных замен, инсерций/делеций, химерных транскриптов и вариации числа копий генов. Набор реагентов применяется в качестве вспомогательного средства для диагностики опухолей человека.

1.3. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОТРЕБИТЕЛЬ

Высокопроизводительное секвенирование (NGS) с использованием набора реагентов должна проводиться квалифицированными специалистами (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник), прошедшими предварительное обучение в области методов молекулярной диагностики и соблюдающими правила работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.4. ОПИСАНИЕ ЦЕЛЕВОГО АНАЛИТА

Целевым анализом является ДНК/РНК, выделенные из образцов опухолей человека, фиксированных в формалине, залитых в парафиновые блоки (FFPE), и цитологических опухолевых препаратов.

1.5. УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов предназначен для эксплуатации в условиях клинико-диагностических лабораторий, выполняющих молекулярно-биологические исследования биологического материала на базе лечебно-профилактических медицинских учреждений соответствующего профиля.

1.6. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика, молекулярная онкология.

1.7. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в молекулярной онкологии для высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) генов, ассоциированных с возникновением злокачественных опухолей человека в качестве вспомогательного средства для диагностики опухолей человека для формирования эффективной стратегии лечения пациентов со злокачественными новообразованиями.

1.8. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания: в рамках установленного производителем назначения, противопоказаний не имеет.

При работе с набором следует использовать только систему высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics» (производства АО «Ферст Генетикс», Россия).

1.9. ВОЗМОЖНЫЕ ПОБОЧНЫЕ ДЕЙСТВИЯ

При использовании специально обученным персоналом, с учетом применения набора реагентов строго по назначению, при соблюдении требований безопасности при работе с набором реагентов, описанных в разделе 5 настоящей инструкции, побочные действия отсутствуют.

1.10. РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

В соответствии с Номенклатурной классификацией медицинских изделий, утвержденной Приказом Минздрава России № 4н от 06.06.2012 г. Набор реагентов относится к классу 2б.

1.11. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.11.1. Обоснованность метода

Молекулярная диагностика в настоящее время играет важную роль в медицине и, в частности, в онкологии, так как возникновение злокачественных новообразований напрямую связано с накоплением мутаций в молекуле ДНК. Важность молекулярного тестирования у пациентов со злокачественными новообразованиями продолжает расти с каждым годом по мере появления большего количества таргетных препаратов. Лечение, ранее основанное на анатомическом происхождении рака (например, легких, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы), расширяется и включает использование геномных тестов для стратификации пациентов на подгруппы, основанные на специфических молекулярных факторах отдельных опухолей. Молекулярно-генетическое тестирование, являясь неотъемлемой частью практической онкологии, позволяет врачам выбирать наиболее подходящие методы лечения

для каждого индивидуального пациента. Клинические рекомендации для лечения различных видов рака содержат указания на перечни схем противоопухолевой лекарственной терапии с использованием таргетных препаратов [1].

Выявление молекулярных мишеней позволяет не только применить более направленное на опухолевые клетки лекарственное воздействие, но и определить прогноз течения заболевания, а также выяснить органную локализацию опухолей с неизвестным первичным очагом.

Важно, что на сегодняшний день одна и та же молекулярная мишень используется в диагностических и лечебных тактиках при различных опухолях, как и то, что одна и та же локализация опухоли характеризуется наличием различных потенциальных таргетируемых мишеней.

В таблице 1 приведены таргетные препараты, зарегистрированные в Российской Федерации, применяемые для лечения солидных опухолей, молекулярные мишени, на которые эти препараты направлены, и типы опухолей, мишени в которых они определяются. Данные представлены на 2019 год и список мишеней, показаний и самих препаратов постоянно расширяется [2].

Таблица 1

Препарат	Мишень	Показания
Аксатиниб (Инлита)	KIT, PDGFR β , VEGFR1/2/3	Рак почки
Алектиниб (Алеценза)	ALK	НМРЛ с транслокацией ALK
Афатиниб (Гилотриф)	EGFR (HER1/ ERBB1), HER2 (ERBB2/ neu)	НМРЛ с мутацией гена EGFR (делеция 19 экзона и замена (L858R) в 21 экзоне)
Афлиберцепт (Залтрап)	PIGF, VEGFA/ B	Колоректальный рак
Бевацизумаб (Авастин)	VEGF	Рак шейки матки
		Колоректальный рак
		Рак яичников
		Глиобластома
		НМРЛ
		Рак почки
		Рак молочной железы
Вандетаниб (Капрелса)	EGFR (HER1/ ERBB1), RET, VEGFR2	Рак щитовидной железы
Вемурафениб (Зелбораф)	BRAF	Меланома с мутацией BRAF V600
Висмодегиб (Эриведж)	PTCH, Smoothed	Базальноклеточный рак кожи
Гефитиниб (Иресса)	EGFR (HER1/ ERBB1)	НМРЛ с мутацией гена EGFR (делеция 19 экзона и замена (L858R) в 21 экзоне)
Дабрафениб (Тафинлар)	BRAF	Меланома с мутациями BRAF V600
		НМРЛ с мутацией BRAF V600E
Деносумаб (Эксджива)	RANKL	Гигантоклеточная опухоль кости

Препарат	Мишень	Показания
		Гиперкальциемия при злокачественных опухолях
Иматиниб (Гливек)	KIT, PDGFR, ABL	ГИСТ (KIT+)
		Дерматофибросаркома
Кабозантиниб (Кабометикс)	FLT3, KIT, MET, RET, VEGFR2	Рак почки
Кобемитиниб (Котеллик)	MEK	Меланома с мутациями BRAF V600E или V600K
Кризотиниб (Ксалкори)	ALK, MET, ROS1	HMPЛ с транслокацией ALK или ROS1
Лапатиниб (Тайверб)	HER2 (ERBB2/ neu), EGFR(HER1/ ERBB1)	Рак молочной железы (HER2+)
Ленватиниб (Ленвима)	VEGFR2	Рак почки
		Рак щитовидной железы
		Гепатоцеллюлярный рак
Олапариб (Линпарза)	PARP	Рак яичников с мутацией BRCA
		Рак молочной железы с мутацией BRCA
Осимертиниб (Тагрисо)	EGFR	HMPЛ с мутацией EGFR T790M
Пазопаниб (Вотриент)	VEGFR, PDGFR, KIT	Рак почки
Пальбоциклиб (Ибранса)	CDK4, CDK6	Рак молочной железы (ЭР+, HER2-)
Панитумумаб (Вектибикс)	EGFR (HER1/ ERBB1)	Колоректальный рак (дикий тип KRAS)
Пертузумаб (Перьета)	HER2 (ERBB2/ neu)	Рак молочной железы (HER2+)
Рамицирумаб (Цирамза)	VEGFR2	Колоректальный рак
		Рак желудка
		HMPЛ
Регорафениб (Стиварга)	KIT, PDGFR β , RAF, RET, VEGFR1/2/3	Колоректальный рак
		ГИСТ
		Гепатоцеллюлярный рак
Рибоциклиб (Кискали)	CDK4, CDK6	Рак молочной железы (ЭР+, HER2-)
Сорафениб (Нексавар)	VEGFR, PDGFR, KIT, RAF	Гепатоцеллюлярный рак
		Рак почки
		Рак щитовидной железы
Темзоролимус (Торизел)	mTOR	Рак почки
Траметиниб (Мекинист)	MEK	Меланома с мутацией BRAF V600
		HMPЛ с мутацией BRAF V600E

Препарат	Мишень	Показания
Трастузумаб (Герцептин)	HER2 (ERBB2/ neu)	Рак молочной железы (HER2+)
Трастузумаб эмтанзин (Кадсила)	HER2	Рак молочной железы (HER2)
Церитиниб (Зикадия)	ALK	НМРЛ с транслокацией ALK
Цетуксимаб (Эрбитукс)	EGFR (HER1/ ERBB1)	Колоректальный рак (KRAS дикий тип)
		Плоскоклеточный рак головы и шеи
Эверолимус (Афинитор)	mTOR	Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и легких
		Рак почки
		Рак молочной железы (ЭР+, HER2-)
		Ангиолипома почки
		НМРЛ с мутацией гена EGFR (делеция 19 экзона и замена (L858R) в 21 экзоне)
Эрлотиниб (Тарцева)	EGFR (HER1/ ERBB1)	Рак поджелудочной железы

В таблице 2 указаны клинические цели, которые достигаются с помощью генетического тестирования [3].

Таблица 2

Клиническое использование биомаркеров	Клиническая цель
Диагноз / дифференциальный диагноз	Окончательно установить наличие и точное описание заболевания.
Классификация	Классифицировать пациентов по подгруппе заболеваний.
Прогноз	Оценить риск или время клинических результатов.
Прогнозирование / стратификация лечения	Предсказать реакцию на конкретные методы лечения и выбрать препарат, который, скорее всего, даст положительный ответ у данного пациента.
Управление рисками, связанными с терапией	Выявить пациентов с высокой вероятностью побочных эффектов лечения.

В последние годы выявление молекулярных мишеней опухоли методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) находит все более широкое применение в клиниках всего мира. Успешное использование высокопроизводительного секвенирования было также продемонстрировано для идентификации новых генетических вариантов при глиобластоме [4], почечно-клеточной карциноме [5], немелкоклеточном раке легкого [6], мелкоклеточном раке легкого [7], раке предстательной железы [8], остром миелобластном лейкозе [9-10], хроническом лимфоцитарном лейкозе [11] и переходно-клеточной карциноме мочевого пузыря [12].

Версия 25.02.2022

1.11.2. Принцип метода

После проведения отбора биоматериала – фрагментов ткани, полученных в ходе операции или биопсии, материал помещают в фиксирующий формалиновый раствор и отправляют в патоморфологическую лабораторию для последующего проведения гистологического исследования, подтверждающего наличие опухолевой ткани в образце.

В патоморфологической лаборатории осуществляется ряд подготовительных процедур:

- фиксация — помещение образца в специальный химический раствор для сохранения структуры ткани;
- процессинг (проводка) — процесс обезвоживания, обезжиривания и пропитки материала парафином;
- заливка парафиновых блоков, в результате чего формируются парафиновые блоки, содержащие образцы тканей. Блоки могут храниться долгие годы и использоваться для проведения дополнительных исследований.
- микротомия — изготовление срезов образцов и их перенесение на специальные предметные стекла, окрашивание стекол со срезами гематоксилином и эозином, выявление и разметка опухолевых клеток.
- направление на генетическое исследование срезов, содержащих не менее 20% опухолевой ткани.

Далее из полученного FFPE-образца или цитологического препарата выделяют нуклеиновые кислоты: сначала срезы парафинового блока подвергаются депарафинизации и протеолизу. Затем образцы помещают на фильтрующие картриджи, которые связывают ДНК, в то время как РНК фильтруется через картридж. Для выделения РНК фильтрат наносят на новый картридж, обрабатывают ДНКазой и затем элюируют РНК через фильтр. ДНК получают, смывая изначально связавшуюся ДНК с картриджа. Далее концентрации выделенных нуклеиновых кислот измеряют с помощью спектрофотометра. Затем с помощью мастер-микса и фермента обратной транскриптазы РНК переводят в комплементарную ДНК (кДНК), то есть проводят реакцию обратной транскрипции.

Далее с помощью специфичных для исследуемых регионов праймеров и фермента для подготовки библиотек проводят реакцию таргетной амплификации отдельно кДНК и отдельно ДНК, выделенных из образцов опухолей человека, фиксированных в формалине, залитых в парафиновые блоки (FFPE), и цитологических опухолевых препаратов, используя различные программы термоциклирования. Праймеры представляют собой олигонуклеотидные последовательности длиной 18-22 п.н., которые фланкируют участки исследуемых генов по фрагментам длиной 200 п.н. Всего на ДНК фланкируются 269 пар праймеров, а на кДНК (полученную из РНК) – 284 пары праймеров, давая суммарно 553 ампликона. В процессе реакции таргетной амплификации, специфичные праймеры отжигаются на исследуемой последовательности геномной ДНК или синтезированной кДНК, и в ходе термоциклирования, синтезируются копии нужных фрагментов исходной геномной ДНК и кДНК.

К каждому образцу, содержащему библиотеки, добавляется специальный фермент для частичного расщепления ампликонов, которое проводится в

термоциклере, после чего также в термоциклере происходит присоединение с помощью фермента лигазы к каждому образцу специфичного олигонуклеотида-адаптера, содержащей индивидуальный молекулярный баркод, представляющий собой уникальную последовательность, которая служит идентификатором образца в пуле. Последующую очистку баркодированных амплифицированных библиотек проводят на магнитных частицах, измеряют концентрации с помощью количественной ПЦР и разводят до нужной концентрации. В случае если получена низкая концентрация библиотек, можно провести дополнительную амплификацию библиотек с последующей очисткой полученного продукта. Далее библиотеки ДНК и РНК объединяют в пул в соотношении 80:20 (ДНК:РНК), чтобы получить различное количество прочтений

Следующие этапы выполняются автоматической станцией пробоподготовки, входящей в состав системы высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics». Сначала происходит клональная амплификация библиотек на поверхности микросфер в процессе эмульсионной ПЦР. Для проведения эмульсионной ПЦР (эмПЦР) формируется «водная фаза» реакции, содержащая микросферы, несущие на поверхности один из праймеров, смесь компонентов для ПЦР, прямой и обратный праймеры, и объединенные в единый пул библиотеки фрагментов ДНК. Водная фаза, в которой проходит амплификация, разбивается на миллионы стабильных микрореакторов одинакового размера путем перемешивания и взбалтывания с масляной фазой для получения эмульсии. Фрагменты ДНК, фланкированные последовательностями универсальных адаптеров, одновременно амплифицируются с использованием одной универсальной пары праймеров. При этом каждый набор ампликонов, образованный от отдельного фрагмента ДНК, останется заключенным в отдельный микрореактор. В эмПЦР используются микросферы, на поверхности которых закреплен один из универсальных праймеров, что делает возможным амплификацию фрагментов ДНК на твердой поверхности микрочастиц. Смесь фрагментов разбавляют таким образом, чтобы каждая микросфера получала лишь по одному фрагменту библиотеки. В такой ситуации большая доля микрореакторов в масляной эмульсии будет содержать одну микросферу и один фрагмент ДНК библиотеки. Это позволяет проводить миллионы невзаимодействующих реакций ПЦР-амплификации в малом объеме. Отдельные фрагменты ДНК библиотеки оказываются «клонально амплифицированными» на микросферах, причем каждая микросфера несет копии только одного исходного фрагмента (является моноклональной).

После эмПЦР эмульсия, полученная на предыдущем этапе, разбивается обработкой изопропанолом и буферным раствором и последующим встряхиванием, центрифугированием и магнитной сепарацией. Полученная смесь представляет собой суспензию «пустых», моноклональных и поликлональных микросфер, происходящих из микрореакторов без фрагментов ДНК, с одним или с несколькими клонами фрагментов ДНК, соответственно. Обогащение моноклональных микросфер с продуктом клональной амплификации достигается за счёт связывания с более крупными, немагнитными стрептавидиновыми частицами из полистирола, обладающими низкой плотностью. Специальные олигонуклеотиды-ловушки, комплементарные последовательности универсального 3'-адаптера отжигаются на фрагментах ДНК исходных библиотек,

которые ковалентно связаны с поверхностью микросфер. Полистирольные частицы через стрептавидин связываются с биотинилированными олигонуклеотидами-ловушками, что приводит к образованию комплексов с низкой плотностью. Смесь центрифугируют для отделения образовавшихся комплексов (микросферы с ДНК, связанные с полистирольными частицами) от «пустых» микросфер, не несущих ампликоны. Комплексы имеют более низкую плотность и остаются в супернатанте, в то время как микросферы без ДНК образуют осадок. Супернатант отделяют и обрабатывают щёлочью для разрушения комплексов. Парамагнитные микросферы с ДНК отделяют от немагнитных полистирольных частиц при помощи магнитной сепарации. Такой протокол позволяет провести многократное обогащение микросфер, несущих одноцепочечные амплифицированные фрагменты ДНК. Для получения готовой для полупроводникового секвенирования матрицы, к микросферам с ДНК добавляют олигонуклеотид-затравку и ДНК-полимеразу для секвенирования, которые образуют комплекс с одноцепочечными фрагментами ДНК, закрепленными на поверхности микросфер. Далее станция пробоподготовки автоматически наносит исследуемые образцы на специализированный чип для полупроводникового секвенирования. Данный процесс является полностью автоматизированным и выполняется на станции пробоподготовки, входящей в состав системы высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics». Чип извлекают из станции пробоподготовки и переносят в генетический секвенатор, входящий в состав системы высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics».

Полупроводниковое секвенирование основано на регистрации локального изменения pH в микролунках на полупроводниковом микрочипе при последовательном удлинении олигонуклеотидной затравки ДНК-полимеразой. Микролунки, содержащие микрочастицы с амплифицированными на поверхности фрагментами ДНК-библиотек, предназначены для секвенирования, поочередно промывают реагентами, содержащими дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP) одного вида, входящими в состав картриджа для секвенирования. Если введенный dNTP является комплементарным к нуклеотиду матрицы, он включается в растущую комплементарную цепь. Это вызывает высвобождение ионов водорода и срабатывание ионного датчика, который указывает, что реакция произошла. Если в последовательности матричной цепи присутствует повтор одного нуклеотида, несколько молекул dNTP будут присоединены в одном цикле. Это приводит к увеличению количества образовавшихся ионов водорода и пропорционально более высокому электрическому сигналу.

Секвенатор считывает сигнал из каждой лунки чипа и формирует пул DAT файлов, содержащих информацию о разнице потенциалов в каждой отдельной лунке во время каждой подачи нуклеотидов. Затем эти данные суммируются, формируя данные по каждой лунке со всеми подачами нуклеотидов (flow). Затем аналоговые значения переводятся в цифровые, формируя файл WELLS. Последний передается с дискового пространства секвенатора на сервер, управляемый программным обеспечением секвенатора. Здесь происходит определение последовательности нуклеотидов и распознавание финальных прочтений. ПО осуществляет тримминг (удаление последовательности адаптеров, удаление 3'-концов низкого качества) и фильтрацию прочтений низкого

качества для увеличения точности консенсусных последовательностей библиотек (удаление коротких фрагментов, димеров адаптеров, прочтения, потерявшие исходно заданный нуклеотидный ключ «нуклеотидный ключ» из 4-х нуклеотидов, прочтения с низким качеством сигнала, поликлональные прочтения). Затем осуществляется распределение прочтений по исходным библиотекам согласно идентифицированным в ходе секвенирования молекулярным баркодам. Полученные последовательности прочтений выравниваются на референсный геном и формируется выходной файл BED. BED файл передается в программное обеспечение «Ion Reporter» (доступ к ПО, установленному на сервере "Ion Reporter", входящему в состав системы "F-Genetics", осуществляется по локальной сети). Биоинформатический протокол обнаруживает и аннотирует соматические варианты с низкой аллельной частотой (SNV, InDels, CNV) из целевых библиотек ДНК, а также сплитные гены из целевых РНК-библиотек (fusion). Поиск вариантов состоит из двух этапов: сначала (с помощью алгоритма FreeBayes) определяются позиции-кандидаты, нуклеотидная последовательность которых отличается от референсной последовательности и для которых аллельная частота превышает заданный порог. На втором этапе производится оценка достоверности таких вариантов и их фильтрация по различным параметрам (качество прочтения основания, покрытие, а также представленность варианта на прямой и обратной цепи). Для изменения числа копий (CNV) используются критерии: 5% доверительный интервал (5% CI) для числа копий отличается от нормального не менее, чем в 2 раза. Транслокация детектируется при выявлении химерных транскриптов, мутация (отклонение от референсной последовательности) в горячих точках мутагенеза детектируется, если вариант встречается в одном из генов в данной панели.

Определяются варианты, которые входят в заданный заранее список вариантов транскрипта, CNV и горячих точек мутагенеза. При минимальном покрытии 500х возможно определение инделей с аллельной частотой не менее 10%, и мутаций из списка горячих точек мутагенеза с аллельной частотой не менее 5%.

Глубина покрытия составляет около 500х, что соответствует около 300 000 (для ДНК) и 50 000 (для РНК) уникальных прочтений на образец (или библиотеку). Прочтения равномерно покрывают целевые области. Выявление SNV и InDels происходит с помощью алгоритма Torrent Variant Caller, выявление CNV выполняется с использованием алгоритма на основе скрытой марковской модели Hidden Markov Model (HMM), выявление химерных транскриптов (fusion) выполняется с использованием биоинформатического алгоритма для обнаружения заданных и неизвестных мутаций химерных транскриптов с участием генов на основе метода перекрывающихся экзонов «Exon tiling method».

1.11.3. Клиническая значимость исследования

Развитие геномных исследований в молекулярной онкологии позволяет не только понять фундаментальные процессы канцерогенеза, но и принести пользу практической медицине. Хотя еще рано говорить о полном понимании механизмов злокачественной трансформации клетки, однако уже накоплено немало информации, которая находит активное применение в клинической практике и приводит к повышению эффективности лечения и снижению его стоимости, а

выявление маркеров прогноза открывает дополнительные возможности для коррекции тактики лечения и улучшения показателей общей и безрецидивной выживаемости пациентов.

Набор реагентов «ОнкоФокус» используется в прецизионной медицине в качестве вспомогательного средства для диагностики опухолей человека **для формирования эффективной стратегии лечения пациентов со злокачественными новообразованиями.**

В таблице 3 приведены гены, указанные в назначении набора реагентов, и виды рака, ассоциированные с отклонениями от референсной последовательности в данных генах [13, 14].

Таблица 3

	Ген	Вид отклонения от референсной последовательности	Вид рака, ассоциированный с отклонениями от референсной последовательности в данном гене
1	ABL1	Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Меланома Колоректальный рак Рак эндометрия
2	AKT1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак щитовидной железы Рак эндометрия Рак молочной железы Рак мочевого пузыря
3	AKT3	Химерные транскрипты	Рак молочной железы
4	ALK	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого
		Вариации числа копий генов	Рак молочной железы
		Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого
5	AR	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак простаты Немелкоклеточный рак легкого Колоректальный рак
		Вариации числа копий генов	Рак простаты
6	AXL	Химерные транскрипты	Рак молочной железы Меланома Колоректальный рак Рак эндометрия Немелкоклеточный рак легкого
7	BRAF	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Колоректальный рак Глиобластома Рак печени Меланома Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Рак щитовидной железы
		Вариации числа копий генов	Рак молочной железы Меланома
		Химерные транскрипты	Пилоидная астроцитома Рак простаты

	Ген	Вид отклонения от референсной последовательности	Вид рака, ассоциированный с отклонениями от референсной последовательности в данном гене
8	CCND1	Вариации числа копий генов	Рак мочевого пузыря Рак молочной железы Рак эндометрия Рак головы и шеи Рак печени Меланома Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Саркома мягких тканей
9	CDK4	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Лимфома
		Вариации числа копий генов	Глиобластома Меланома Немелкоклеточный рак легкого Саркома мягких тканей
10	CDK6	Вариации числа копий генов	Глиобластома Рак головы и шеи Рак почек Рак поджелудочной железы
11	CTNNB1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Колоректальный рак Рак эндометрия Рак печени Рак яичников Рак поджелудочной железы Рак щитовидной железы
12	DDR2	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Колоректальный рак Рак эндометрия Рак мочевого пузыря
13	EGFR	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Глиобластома Немелкоклеточный рак легкого
		Вариации числа копий генов	Рак мочевого пузыря Рак головы и шеи Немелкоклеточный рак легкого
		Химерные транскрипты	Глиобластома
14	ERBB2	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак мочевого пузыря
		Вариации числа копий генов	Рак мочевого пузыря Колоректальный рак Рак эндометрия Рак головы и шеи Немелкоклеточный рак легкого
		Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого
15	ERBB3	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Колоректальный рак
16	ERBB4	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого Меланома Колоректальный рак Рак эндометрия

	Ген	Вид отклонения от референсной последовательности	Вид рака, ассоциированный с отклонениями от референсной последовательности в данном гене
			Рак молочной железы
17	ERG	Химерные транскрипты	Рак простаты Саркома мягких тканей
18	ESR1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак эндометрия
19	ETV1	Химерные транскрипты	Рак простаты
20	ETV4	Химерные транскрипты	Рак простаты
21	ETV5	Химерные транскрипты	Рак простаты
22	FGFR1	Вариации числа копий генов	Рак мочевого пузыря Рак молочной железы Колоректальный рак Рак эндометрия Рак головы и шеи Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Рак поджелудочной железы Рак простаты Саркома мягких тканей
		Химерные транскрипты	Глиобластома
23	FGFR2	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак эндометрия Рак молочной железы
		Вариации числа копий генов	Рак эндометрия
		Химерные транскрипты	Холангиокарцинома
24	FGFR3	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак мочевого пузыря Рак головы и шеи
		Вариации числа копий генов	Рак мочевого пузыря Рак яичников
		Химерные транскрипты	Глиобластома Немелкоклеточный рак легкого
25	FGFR4	Вариации числа копий генов	Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Меланома Колоректальный рак Рак эндометрия
26	GNA11	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Меланома
27	GNAQ	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Меланома
28	HRAS	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак мочевого пузыря Рак головы и шеи Рак поджелудочной железы Рак простаты Саркома мягких тканей
29	IDH1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Глиобластома Рак печени Меланома Рак простаты

	Ген	Вид отклонения от референсной последовательности	Вид рака, ассоциированный с отклонениями от референсной последовательности в данном гене
			Рак поджелудочной железы
30	IDH2	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак печени
31	JAK1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак эндометрия Рак молочной железы Рак простаты Немелкоклеточный рак легкого Колоректальный рак
32	JAK2	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Колоректальный рак Рак эндометрия
33	JAK3	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Колоректальный рак Рак яичников Рак эндометрия
34	KIT	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Меланома Рак яичников
		Вариации числа копий генов	Глиобластома
35	KRAS	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак мочевого пузыря Колоректальный рак Рак эндометрия Рак печени Меланома Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Рак поджелудочной железы Рак простаты Саркома мягких тканей Рак щитовидной железы
		Вариации числа копий генов	Рак головы и шеи Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Рак поджелудочной железы
36	MAP2K1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Меланома
37	MAP2K2	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Колоректальный рак Немелкоклеточный рак легкого Меланома Рак молочной железы Рак яичников Рак эндометрия
38	MET	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак головы и шеи
		Вариации числа копий генов	Глиобластома
		Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого
39	MTOR	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак эндометрия Колоректальный рак

	Ген	Вид отклонения от референсной последовательности	Вид рака, ассоциированный с отклонениями от референсной последовательности в данном гене
			Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Рак яичников Рак мочевого пузыря
40	MYC	Вариации числа копий генов	Рак мочевого пузыря Рак молочной железы Колоректальный рак Рак эндометрия Рак печени Меланома Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Рак поджелудочной железы Рак простаты
41	MYCN	Вариации числа копий генов	Глиобластома
42	NRAS	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Колоректальный рак Рак эндометрия Рак головы и шеи Рак печени Меланома Саркома мягких тканей Рак щитовидной железы
43	NTRK1	Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого Рак щитовидной железы
44	NTRK2	Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого Рак эндометрия Колоректальный рак Меланома Рак простаты
45	NTRK3	Химерные транскрипты	Рак молочной железы
46	PDGFRA	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	GIST
		Вариации числа копий генов	Глиобластома
		Химерные транскрипты	Глиобластома
47	PIK3CA	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак мочевого пузыря Рак молочной железы Колоректальный рак Рак эндометрия Рак головы и шеи Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников Саркома мягких тканей
		Вариации числа копий генов	Рак эндометрия Глиобластома Рак головы и шеи Немелкоклеточный рак легкого Рак яичников
48	PPARG	Химерные транскрипты	Рак щитовидной железы

	Ген	Вид отклонения от референсной последовательности	Вид рака, ассоциированный с отклонениями от референсной последовательности в данном гене
49	RAF1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого Меланома
		Химерные транскрипты	Рак простаты
50	RET	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Рак щитовидной железы
		Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого Рак щитовидной железы
51	ROS1	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого
		Химерные транскрипты	Немелкоклеточный рак легкого
52	SMO	Нуклеотидные замены/инсерции/делеции	Немелкоклеточный рак легкого Рак молочной железы Колоректальный рак Меланома Рак эндометрия Глиобластома

Использование набора реагентов «ОнкоФокус» позволяет своевременно выявлять молекулярные мишени опухоли и назначать эффективное лечение, с учетом выявленных маркеров прогноза агрессивности опухоли, эффективности или резистентности опухоли к тем или иным препаратам. Кроме того, использование набора позволяет осуществить дифференциальный диагноз между опухолями различного происхождения, но схожими патоморфологическими признаками, стадирование и дифференциацию между первичным очагом и метастазами.

Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать врачу-генетику или врачу-онкологу в сочетании с данными анамнеза и других инструментальных и лабораторных исследований.

1.11.4. Функциональные характеристики набора

1.11.4.1. Типы выявляемых отклонений от референсной последовательности

Набор реагентов позволяет выявлять:

- **Нуклеотидные замены:**
 - простые (однонуклеотидные замены (SNV, single nucleotide variants));
 - сложные (двух-, трехнуклеотидные замены (complex SNV));
- **InDels (индели) (инсерции/делеции):**
 - инсерции (вставка нуклеотидной последовательности, ins);
 - делеции (утрата нуклеотидной последовательности, del);
- **Вариации числа копий генов (CNV, copy nucleotide variants):**
 - амплификация гена (увеличение числа копий генов, amp);
 - делеция гена (уменьшение числа копий генов, loss);
- **Химерные транскрипты:**
 - продукты слияния генов (Fusion)

1.11.4.2. Аналитические характеристики набора

1.11.4.2.1. Предел обнаружения и аналитическая чувствительность

Определение предела обнаружения (минимального количества ДНК/РНК, которое используется для анализа) и аналитической чувствительности проводили путем тестирования стандартных образцов предприятия. Определяли последовательность генов, указанных в паспорте стандартного образца предприятия. Предел обнаружения определяли как минимальное количество ДНК/РНК, при котором 100% образцов дают правильные вызовы оснований. Аналитическую чувствительность набора «ОнкоФокус» определяли как процент образцов, дающих правильные вызовы оснований при содержании ДНК/РНК в образце в количестве 10 нг.

Значения характеристики, приведенные в таблице 4, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 4

Показатель	Значение		
	Аналитическая чувствительность (кол-во образцов, дающих правильные вызовы оснований/кол-во образцов), %	Предел обнаружение (минимальное количество ДНК, которое используется для анализа), нг	Предел обнаружение (минимальное количество РНК, которое используется для анализа), нг
Секвенирование генов ABL1, AKT1, AKT3, ALK, AR, AXL, BRAF, CDK4, CDK6, CCND1, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, MYC, MYCN, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, PPARG, RAF1, RET, ROS1, SMO при использовании стандартного образца предприятия «СОП WT-Ж»	100 (48/48)	10	10
Секвенирование генов ABL1, AKT1, AKT3, ALK, AR, AXL, BRAF, CDK4, CDK6, CCND1, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11,	100 (48/48)	10	10

Показатель	Значение		
	Аналитическая чувствительность (кол-во образцов, дающих правильные вызовы оснований/кол-во образцов), %	Предел обнаружение (минимальное количество ДНК, которое используется для анализа), нг	Предел обнаружение (минимальное количество РНК, которое используется для анализа), нг
GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, MYC, MYCN, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, PPARG, RAF1, RET, ROS1, SMO при использовании стандартного образца предприятия «СОП WT-M»			
Суммарная аналитическая чувствительность:		100 (96/96)	

1.11.4.2.2. Входное количество ткани и содержание опухоли в ткани

Определение входного количества ткани и содержание опухоли в ткани набора «ОнкоФокус» проводили путем тестирования образцов ткани, содержащих различное количество опухолевых клеток.

Значения характеристики, приведенные в таблице 5, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 5

Характеристика набора	Значение	
Входное количество ткани (размер срезов 3 x 6 мм)	опухоли ≥ 20% без макродиссекции	-
	образцы с содержанием опухолевых клеток от <10% до 20% после макродиссекции	
Содержание опухоли в ткани	опухоли ≥ 20% без макродиссекции	Секвенирование выполнено успешно. 100% образцов дают правильные вызовы оснований.
	опухоли 10-20% после макродиссекции	

Необходимо, чтобы процент опухолевых клеток в образце составлял не менее 20%, в случае если процент опухолевых клеток в образце составлял 10-20%, то образцы тканей могут быть подвергнуты макродиссекции и обогащены опухолевыми клетками.

1.11.4.2.3. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность определяли как способность набора секвенировать указанные в назначении гены, а не другие гомологичные гены и микроорганизмы. Для определения аналитической специфичности набора «ОнкоФокус» оценивали способность набора секвенировать гены, указанные в назначении набора, при наличии патогенов, которые потенциально могут присутствовать в образцах опухолей.

Значения характеристики приведены в таблице 6.

Таблица 6

Характеристика набора	Показатель		Значение
Аналитическая специфичность (кол-во образцов, дающих правильные вызовы оснований при наличии указанных патогенов /кол-во образцов), %	Образец биоптата шейки матки без злокачественного новообразования с дисплазией эпителиальной ткани (HSIL) с обнаруженными микроорганизмами:	HPV 16 типа (+) в концентрации $4,22 \times 10^5$ копий ДНК/мл	100 (8/8)
		HSV 1 типа (+) в концентрации $1,54 \times 10^4$ копий ДНК/мл	
	Образец биоптата шейки матки без злокачественного новообразования с дисплазией эпителиальной ткани (HSIL) с обнаруженными микроорганизмами:	HPV 16 типа (+) в концентрации $1,89 \times 10^3$ копий ДНК/мл	100 (8/8)
		HSV 2 типа (+) в концентрации $3,07 \times 10^3$ копий ДНК/мл	
	Образец биоптата шейки матки без злокачественного новообразования с дисплазией эпителиальной ткани (LSIL) с обнаруженными микроорганизмами:	CMV (+) в концентрации $2,0 \times 10^4$ копий ДНК/мл	100 (8/8)
	Образец биоптата шейки матки без злокачественного новообразования без дисплазии эпителиальной ткани (NILM) с обнаруженными микроорганизмами:	HSV 2 типа (+) в концентрации $2,19 \times 10^3$ копий ДНК/мл	100 (8/8)
	Образец биоптата шейки матки с инвазивным раком шейки матки с обнаруженными микроорганизмами:	HPV 16 типа (+) в концентрации $3,25 \times 10^4$ копий ДНК/мл	100 (8/8)
	Образец биоптата шейки матки с инвазивным раком шейки матки с выявленным отсутствием микроорганизмов:	HPV 16, 18 типа (-)	100 (8/8)
		HSV 1, 2 типа (-)	
		CMV (-)	
	Образец биоптата полипа толстого кишечника без злокачественного новообразования у пациентов с известным составом микробиоты толстого кишечника, определенным культуральным методом с	Патоген	KOE/мл
		<i>E.coli</i> Lac(+)	10^8
		<i>E.coli</i> Lac(-)	0
		<i>E.coli</i> Гем (+)	0
		<i>Enterococcus</i> spp.	10^6
		<i>Enterococcus</i> Гем (+) spp.	0

Характеристика набора	Показатель			Значение
	обнаруженными микроорганизмами:	Proteus spp.	0	
		Klebsiella spp.	0	
		Citrobacter spp.	0	
		Enterobacter spp.	10 ³	
		Hafnia spp.	0	
		Serratia spp.	0	
		Providencia spp.	0	
		Pseudomonas spp.	0	
		Стафилококки коагулозанегативные	10 ⁵	
		S. aureus	0	
		Бифидобактерии	10 ⁸	
		Лактобациллы	10 ⁷	
		Клостридии	0	
		Образец биоптата полипа толстого кишечника с колоректальным раком у пациентов с определенным составом известным составом микробиоты толстого кишечника, определенным культуральным методом с выявленными микроорганизмами:	Патоген	
	E.coli Lac(+)		10 ⁷	
	E.coli Lac(-)		0	
	E.coli Гем (+)		0	
	Enterococcus spp.		10 ⁸	
	Enterococcus Гем (+) spp.		0	
	Proteus spp.		0	
	Klebsiella spp.		10 ³	
	Citrobacter spp.		0	
	Enterobacter spp.		0	
	Hafnia spp.		0	
	Serratia spp.		0	
	Providencia spp.		0	
	Pseudomonas spp.		0	
	Стафилококки коагулозанегативные		10 ⁴	
	S. aureus		0	
	Бифидобактерии		10 ⁹	
	Лактобациллы		10 ⁸	
	Клостридии	0		
	геномная ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл с обнаруженными микроорганизмами:	HPV 16 типа (+) в концентрации 1,37x10 ⁴ копий ДНК/мл		100 (8/8)
HSV 1 типа (+) в концентрации 2,65x10 ³ копий ДНК/мл				
геномная ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл с	HSV 1 типа (+) в концентрации 2,88x10 ⁵ копий ДНК/мл		100 (8/8)	

Характеристика набора	Показатель		Значение	
	обнаруженными микроорганизмами:	CMV (+) в концентрации 4,69x10 ⁴ копий ДНК/мл		
	геномная ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл с выявленным отсутствием микроорганизмов:	HPV 16, 18 типа (-)	100 (8/8)	
		HSV 1, 2 типа (-)		
		CMV (-)		
	геномная ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл с выявленными микроорганизмами:	Патоген	КОЕ/мл	100 (8/8)
		E.coli Lac(+)	10 ⁷	
		E.coli Lac(-)	0	
		E.coli Гем (+)	0	
		Enterococcus spp.	10 ⁶	
		Enterococcus Гем (+) spp.	0	
		Proteus spp.	0	
		Klebsiella spp.	0	
		Citrobacter spp.	0	
		Enterobacter spp.	10 ⁴	
		Hafnia spp.	0	
		Serratia spp.	0	
		Providencia spp.	0	
		Pseudomonas spp.	0	
		Стафилококки коагулозанегативные	0	
		S. aureus	10 ⁴	
		Бифидобактерии	10 ⁹	
		Лактобациллы	10 ⁹	
	Клостридии	0		
Суммарная аналитическая специфичность:			100 (96/96)	

Для определения аналитической специфичности *in silico* набора «ОнкоФокус» оценивали специфичность праймеров в панелях для создания ДНК- и РНК-библиотек, входящих в состав набора реагентов «ОнкоФокус», к бактериальным и вирусным микроорганизмам, которые потенциально могут присутствовать в образцах опухолей.

Значения характеристики приведены в таблице 7.

Таблица 7

Микроорганизм	Аналитическая специфичность (отсутствие несоответствий ≤ 4 п.н./кол-во образцов), %
HPV 16 типа	100
HPV 18 типа	100
HSV 1 типа	100
HSV 2 типа	100
CMV	100

Микроорганизм	Аналитическая специфичность (отсутствие несоответствий ≤ 4 п.н./кол-во образцов), %
<i>E.coli</i> Lac(+)	100
<i>E.coli</i> Lac(-)	100
<i>E.coli</i> Гем (+)	100
<i>Enterococcus</i> spp.	100
<i>Enterococcus</i> Гем (+) spp.	100
<i>Proteus</i> spp.	100
<i>Klebsiella</i> spp.	100
<i>Citrobacter</i> spp.	100
<i>Enterobacter</i> spp.	100
<i>Hafnia</i> spp.	100
<i>Serratia</i> spp.	100
<i>Providencia</i> spp.	100
<i>Pseudomonas</i> spp.	100
Стафилококки коагулозанагативные	100
<i>S. aureus</i>	100
Бифидобактерии	100
Лактобациллы	100
Клостридии	100

Оценена специфичность праймеров в панелях для создания ДНК- и РНК-библиотек, входящих в состав набора реагентов «ОнкоФокус», путем анализа перекрестной реактивности методом *in silico*. Праймеры, входящие в набор реагентов, специфичны для намеченных целевых последовательностей.

Потенциально интерферирующими веществами могут быть формалин, фиксирующий ткань, во время подготовки образца, протеаза, ксилол, этанол, парафин, содержание гемоглобина в образце, содержание некротической ткани в образце. Влияние интерферирующих веществ устраняется следующим образом:

- оптимальным для фиксации является 10%-ный раствор формалина, забуференный при pH 6,8-7,0, время фиксации не более 24 часов. Не рекомендуется использовать фиксирующие растворы с неустановленным pH. Кислый формалин приводит к образованию в ткани формалинового пигмента, вследствие взаимодействия с гемоглобином, что снижает качество образца;
- добавление протеазы в образец в концентрации 20 мг/мл не оказывает интерферирующего влияния на результаты тестирования набора;
- более длительная инкубация ксилолом (до 15 мин) и значительный избыток ксилола (до 200 мкл) на этапе депарафинизации могут оказывать влияние на качество образца, однако не оказывают интерферирующего влияния на результаты тестирования набора реагентов;
- остаток этанола (до 5% от общего объема реакционной смеси) в образцах в процессе очистки библиотек может негативно повлиять на качество библиотеки и секвенирование данных. При отмывке образца на магнитных частицах необходимо убедиться, что пробирка высушена и не содержит остатков этанола;
- избыток парафина (до количества, эквивалентного размеру образца) не оказывает интерферирующего влияния на результаты исследования, однако может забивать картридж и снижать выход нуклеиновых кислот. Чтобы избежать этого, не следует превышать количество срезов (в одной реакции может быть

использовано до четырех срезов толщиной 20 мкм, оптимальный размер образца 4x4 мм);

- наличие гемоглобина в образце в концентрации 4 мг/мл не оказывает интерферирующего влияния на результаты тестирования набора;
- допустимое содержание некротической ткани в образце не должно превышать 60%.

1.11.4.2.4. Повторяемость и воспроизводимость

Повторяемость результата набора «ОнкоФокус» оценивали путем тестирования разведений стандартных образцов предприятия одним оператором, на одном приборе в один день. Воспроизводимость результата набора «ОнкоФокус» оценивали путем тестирования разведений стандартных образцов предприятия двумя операторами, на двух разных приборах, в разные дни. Определяли последовательность генов, указанных в паспорте стандартного образца предприятия.

Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 96 повторях, для оценки воспроизводимости – в 192 повторях.

Значения характеристик, приведенные в таблицах 8 и 9, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 8

Повторяемость

Обозначение СОП	Всего количеств повторений /система «F-Genetics Плюс»	Позитивное согласие (Система «F-Genetics Плюс»)	Негативное согласие (Система «F-Genetics Плюс»)	Повторяемость, %	Всего количеств повторений /система «F-Genetic»	Позитивное согласие (Система «F-Genetic»)	Негативное согласие (Система «F-Genetic»)	Повторяемость, %
СОП Ж-10 ДНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП Ж-15 ДНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП Ж-10 РНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП Ж-15 РНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП М-10 ДНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП М-15 ДНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП М-10 РНК	6	6	0	100	6	6	0	100
СОП М-15 РНК	6	6	0	100	6	6	0	100

Воспроизводимость

Обозначение СОП	Всего количеств повторений /система «F-Genetics Плюс»	Позитивное согласие (Система «F-Genetics Плюс»)	Негативное согласие (Система «F-Genetics Плюс»)	Воспроизводимость, %	Всего количеств повторений /система «F-Genetic»	Позитивное согласие (Система «F-Genetic»)	Негативное согласие (Система «F-Genetic»)	Воспроизводимость, %
СОП Ж-10 ДНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП Ж-15 ДНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП Ж-10 РНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП Ж-15 РНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП М-10 ДНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП М-15 ДНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП М-10 РНК	12	12	0	100	12	12	0	100
СОП М-15 РНК	12	12	0	100	12	12	0	100

1.11.4.3. Процент позитивного согласия и процент негативного согласия набора

Для определения характеристик процентов позитивного и негативного согласия набора «ОнкоФокус» были использованы 176 образцов опухолей человека, фиксированных в формалине, залитых в парафиновые блоки (FFPE), и цитологических опухолевых препаратов.

В качестве референтного метода для выявления наличия или отсутствия отклонений от референсной последовательности использовали метод высокопроизводительного секвенирования с использованием генетического секвенатора MiSeq (ПУ № РЗН 2014/1568), метод секвенирования по Сэнгеру с использованием анализатора генетического Applied Biosystems 3500 Dx (ПУ № ФСЗ 2011/09862), метод сравнительной геномной гибридизации с использованием системы анализа нуклеиновых кислот «Геноскан 3000» (ПУ № ФСР 2010/08511), метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH – fluorescence in situ hybridization) с использованием ДНК-зондов для диагностики солидных опухолей. В ходе испытаний использовали зонды производства Kreatech Biotechnology B.V. (ПУ № ФСЗ 2012/13468). Оценку сигнала осуществляли с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (ПУ № ФЗС 2009/04802) с помощью ПО Isis версии 2.0 (ПУ № ФСЗ 2009/05560).

Результаты тестирования набора в сравнении с референтным методом приведены в таблице 10.

Таблица 10

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «ОнкоФокус»

Всего исследовано образцов	Результаты испытаний	
176	с истинно положительными результатами	128
	с истинно отрицательными результатами	48
	имеющие ложноположительный результат	0
	имеющие ложноотрицательный результат	0

Значения процента позитивного согласия и процента негативного согласия набора «ОнкоФокус» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблицах 11-12.

Таблица 11

Характеристики процентов позитивного и негативного согласия

Сокращения, представленные в таблице:

ИП – истинно положительные

ИО – истинно отрицательные

ЛП – ложно положительные

ЛО – ложно отрицательные

Результаты тестирования

Отклонения от референсной последовательности	ИП	ЛП	ИО	ЛО	Всего	Процент позитивного согласия (с доверительной вероятностью 95 %), %
Нуклеотидная замена (SNV)	79	0	0	0	79	100,0 (96,3-100%)
Инсерции/делеции (InDels)	5	0	0	0	5	100,0 (54,9-100%)
Вариация числа копий генов (CNV)	21	0	0	0	21	100,0 (86,7-100%)
Химерный транскрипт (fusion)	23	0	0	0	23	100,0 (87,8-100%)
Всего выявленных отклонений:	128	0	0	0	128	100,0 (97,7-100%)

Таблица 12

Отсутствие отклонений от референсной последовательности	ИП	ЛП	ИО	ЛО	Всего	Процент негативного согласия (с доверительной вероятностью 95 %), %
Всего выявленных отсуствий отклонений от реф. последовательности	0	0	48	0	48	100,0 (93,9-100%)

1.11.4.4. Биоинформатические параметры набора

1.11.4.4.1 Длина прочтения и количество прочтений на один образец

Проверку длины прочтения и количества прочтений проводили с помощью специализированных биоинформатических средств из «сырых» данных, содержащихся в FastQ файле.

Показатель количества прочтений на один образец используется как критерий качества прочтения каждого образца.

Значения характеристики, приведенные в таблице 13, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 13

Вариант исполнения набора реагентов	Длина прочтения	Количество прочтений на один образец
Набор реагентов «ОнкоФокус 64»	>75 п.н. для ДНК >60 п.н. для РНК	не менее 300 000 для ДНК не менее 50 000 для РНК
Набор реагентов «ОнкоФокус 32 авто»	>75 п.н. для ДНК >60 п.н. для РНК	не менее 300 000 для ДНК не менее 50 000 для РНК

1.11.4.4.2. Точность прочтения

Для оценки точности прочтения используется шкала Phred. В процессе выравнивания прочтений на референсную последовательность любое расхождение с референсной последовательностью (биологическое или техническое, означающее реальный вариант или ошибку секвенирования) указывается как несоответствие. В результате выравнивания на референсную последовательность каждое прочтение оснований классифицируется как корректное или некорректное. Точность прочтения оценивается в процессе выравнивания прочтений на референсную последовательность.

Значения характеристики, приведенные в таблице 14, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 14

Показатель	Значение
Точность прочтения	не менее 98,5%

1.11.4.4.3. Процент целевых прочтений

Процент целевых прочтений определяли как количество прочтений, которые были картированы на целевые регионы. Процент целевых прочтений рассчитывали как количество прочтений, картированных на целевую область, деленное на общее количество прочтений, умноженное на 100%.

Значения характеристики, приведенные в таблице 15, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 15

Показатель	Значение
Процент целевых прочтений	не менее 90%

1.11.4.4.4. Равномерность покрытия

Равномерность покрытия определяли как процент нуклеотидов во всех целевых регионах, которые покрыты не менее 20% от средней глубины покрытия нуклеотидов. Суммарное значение покрытия линейно интерполируется между ближайшими целочисленными значениями глубины прочтения нуклеотидов.

Значения характеристики, приведенные в таблице 16, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 16

Показатель	Значение
Равномерность покрытия	не менее 90%

1.11.4.4.5. Средняя глубина покрытия

Средняя глубина покрытия используется для контроля качества прочтения образца и рассчитывается из данных количества прочтений на один образец, средней длины фрагмента и количества ампликонов.

Значения характеристики, приведенные в таблице 17, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 17

Показатель	Значение
Средняя глубина покрытия	500x

1.11.4.4.6. Медиана абсолютных значений всех парных отклонений (показатель MAPD, Median of the Absolute values of all Pairwise Differences)

Для оценки качества образца используется показатель MAPD – медиана абсолютных значений всех парных отклонений. Показатель MAPD используется для оценки изменчивости выборки и определения полезны ли данные для анализа. Образцы с показателем качества >0,5 бракуются. Величина показателя MAPD приведена в таблице 18.

Таблица 18

Показатель	Значение
Медиана абсолютных значений всех парных отклонений (показатель MAPD)	менее 0,5

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Варианты исполнения, состав и комплектность

Набор выпускается в двух вариантах исполнения (варианты исполнения, состав и комплектность поставки см. в таблицах 19, 20 и 21). Все варианты исполнения предназначены для высокопроизводительного секвенирования (NGS) следующего поколения (NGS) генов, ассоциированных с возникновением опухолей человека. Варианты исполнения различаются по способу подготовки библиотек – ручному («ОнкоФокус 64») или автоматическому («ОнкоФокус 32 авто»), по количеству чипов для секвенирования и, соответственно, по количеству образцов, которые могут быть проанализированы с помощью одного набора. Вариант исполнения «ОнкоФокус 64» предназначен для анализа 64 образцов, 16 образцов за 1 запуск, вариант исполнения «ОнкоФокус 32 авто» предназначен для анализа 32 образцов, 16 образцов за 1 запуск.

Таблица 19

Варианты исполнения набора		
Вариант исполнения	Комплект реагентов/материалов/картриджей/чипов	Кол-во, шт.
Вариант исполнения «ОнкоФокус 64»	1.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт»	3 шт.
	1.2. Набор реагентов для обратной транскрипции	1 шт.
	1.3. Набор «ОФ» для ручного создания библиотек	4 шт.
	1.4. Набор баркодов 1-16	1 шт.
	1.5. Набор для измерения концентрации библиотек	1 шт.
	1.6. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке)	2 шт.
	1.7. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки	4 шт.
	1.8. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке)	1 шт.
	1.9. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке)	1 шт.
	1.10. Набор растворов «ОФ» для секвенирования	1 шт.
	1.11. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке)	1 шт.
Вариант исполнения «ОнкоФокус 32 авто»	2.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт»	2 шт.
	2.2. Набор реагентов для обратной транскрипции	1 шт.
	2.3. Набор «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек	1 шт.
	2.4. Набор для измерения концентрации библиотек	1 шт.
	2.5. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке)	1 шт.
	2.6. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки	4 шт.
	2.7. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке)	1 шт.
	2.8. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке)	1 шт.
	2.9. Набор растворов «ОФ» для секвенирования	1 шт.
	2.10. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке)	1 шт.

Состав набора

Компонент набора	Объем	Кол-во	Внешний вид изделия	
1. «ОнкоФокус 64», в составе:				
1.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», 3 шт.:	1.1.1. Лизирующий буфер	16 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного бесцветного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	1.1.2. Изолирующий реагент ¹ 	19,2 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из непрозрачного коричневого пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	1.1.3. Отмывочный концентрат 1 ¹  	60 мл*	1 флакон	Флакон с квадратным дном из прозрачного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	1.1.4. Отмывочный концентрат 2/3	60 мл*	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного коричневого пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	1.1.5. Протеаза ¹ 	160 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся зеленой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	1.1.6. Раствор для элюции	5 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного бесцветного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	1.1.7. ДНКаз	160 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся синей крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	1.1.8. Буфер для ДНКаз, 10X	240 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся прозрачной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	1.1.9. Фильтрующие картриджи	-	2x20 картриджей	2 пакета полиэтиленовых с застёжкой Zip-Lock, каждый из которых содержит по 20 картриджей. Картридж представляет собой трубку из полупрозрачного

¹ Реагенты содержат опасные вещества. Информацию по опасным веществам и мерам предосторожности при работе с реагентами см. в разделе инструкции «Меры предосторожности и предупреждения».

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия	
				пластика, в одном конце которой содержится фильтр белого цвета	
	1.1.10 Собирающие пробирки	-	2х 40 пробирок	2 пакета полиэтиленовых с застёжкой Zip-Lock, каждый из которых содержит по 40 конических пробирок с крышкой объемом 2 мл.	
	1.1.11. РНКаза А	400 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.	
1.2. Набор реагентов для обратной транскрипции:	1.2.1. Фермент для обратной транскрипции, 10X	100 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся черной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.	
	1.2.2. Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X	200 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся лиловой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.	
1.3. Набор «ОФ» для ручного создания библиотек, 4 шт.:	1.3.3. Набор для создания библиотек, 4 шт.:	1.3.1. Панель «ОФ» для создания ДНК-библиотек, 5X	64 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся синей крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.2. Панель «ОФ» для создания РНК-библиотек, 5X	64 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся красной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.1. Фермент для создания библиотек, 5X	40 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся красной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.2. Фермент для частичного расщепления ампликонов	16 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся коричневой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.3. Стоп-раствор	32 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся желтой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.4. ДНК-лигаза	16 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся синей крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.5. Набор для ПЦР-обогащения библиотек	400 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся черной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.6. Праймеры для	16 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся

Компонент набора			Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
		амплификации и библиотек			белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
		1.3.3.7. Буферный раствор LowTE	6 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного бесцветного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
1.4. Набор баркодов 1-16:	1.4.1. Адаптер для библиотек	320 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся лиловой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.	
	1.4.2. Баркод 1	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.3. Баркод 2	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.4. Баркод 3	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.5. Баркод 4	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.6. Баркод 5	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.7. Баркод 6	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.8. Баркод 7	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	
	1.4.9. Баркод 8	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода	

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
	1.4.10. Баркод 9	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.11. Баркод 10	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.12. Баркод 11	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.13. Баркод 12	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.14. Баркод 13	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.15. Баркод 14	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.16. Баркод 15	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
	1.4.17. Баркод 16	20 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость. На крышку нанесен номер баркода
1.5. Набор для измерения концентрации библиотек:	1.5.1. Мастер-микс для кПЦР, 2X	2 x 1,25 мкл	2 пробирки	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся бесцветной крышкой с синим верхом, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	1.5.2. Панель для измерения концентрации библиотек, 20X	250 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся бесцветной крышкой с красным верхом, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	1.5.3. Контрольная библиотека	2 x 2,5 мкл	2 пробирки	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся бесцветной крышкой с

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
	для реакции кПЦР			желтым верхом, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
1.6. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке), 2 шт.	Полупроводниковый чип 520	-	4 чипа	Чипы, запаянные в индивидуальные фольгированные упаковки
1.7. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки - 4 шт.:	1.7.1. Планшет 96-луночный	-	1 планшет	Планшет 96-луночный из прозрачного пластика размером 12х8 см
	1.7.2. Профольгированная крышка	-	1 крышка	Крышка профольгированная размером 13,3 x 9,3 см
	1.7.3. Наконечники одноразовые (96 шт. в штативе)	-	1 штатив	Штатив с наконечниками (96 шт., в том числе 54 наконечника объемом 1000 мкл, 40 наконечников объемом 200 мкл, 2 прокалывателя)
	1.7.4. Пробирки	-	12 пробирок	Пробирки для разбивания эмульсии объемом 2 мл
	1.7.5. Крышка для центрифуг	-	2 штуки	Крышки для центрифуг станции пробоподготовки диаметром 12 см
	1.7.6. Штатив с пробирками для модуля обогащения	-	1 штатив	В штативе 8 пробирок объемом 1,5 мл
	1.7.7. Адаптер для чипа		2 адаптера	Пластиковый адаптер
1.8. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке) ¹ : 	Картридж «ОФ» с растворами для амплификации и библиотек для станции пробоподготовки	-	4 картриджа	Картридж содержит 24 профольгированные лунки, из них 8 лунок объемом 5 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость объемом 4 мл и 15 лунок объемом 2 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость объемом 1,5 мл, 1 лунка объемом 2 мл (третья в первом ряду) содержит прозрачную жидкость объемом 1 мл с осадком коричневого цвета
1.9. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке) ¹ : 	Картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	-	4 картриджа	Картридж содержит 20 профольгированных лунок, из них 4 лунки объемом 5 мл пустые, 15 лунок объемом 2 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость, 1 лунка (первая во втором ряду) содержит прозрачную

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
				розовую жидкость, а также и 4 лунки с вставленными пробирками: позиция А: пустая прозрачная пробирка для образцов объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой; позиция В: пустая прозрачная пробирка для образцов объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой; позиция С: прозрачная пробирка объемом 1,5 мл с закручивающейся красной крышкой, содержащей 2М NaOH; позиция D: пустая прозрачная пробирка объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой.
1.10. Набор растворов «ОФ» для секвенирования:	1.10.1. Промывочный раствор «ОФ»	1,5 л	4 бутылки	Бутыль из белого пластика, запаянная в фольгу, содержащая бесцветную жидкость
	1.10.2. Раствор для очистки «ОФ»	250 мл	1 бутыль	Бутыль из прозрачного пластика, содержащая бесцветную жидкость
1.11. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке) ¹ : 	Картридж «ОФ» с реагентами для секвенирования	-	4 картриджа	Картридж содержит 5 лунок фиолетового, черного, синего, зеленого и красного цветов, каждая из которых сообщается с отдельной емкостью с реагентами.
К набору реагентов прилагаются краткое руководство по применению набора и паспорт качества				
2. «ОнкоФокус 32 авто», в составе:				
2.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», 2 шт.:	2.1.1. Лизирующий буфер	16 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного бесцветного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	2.1.2. Изолирующий реагент ¹ 	19,2 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из непрозрачного коричневого пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	2.1.3. Отмывочный концентрат 1 ¹ 	60 мл*	1 флакон	Флакон с квадратным дном из прозрачного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	2.1.4. Отмывочный концентрат 2/3	60 мл*	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного коричневого пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	2.1.5. Протеаза ¹	160 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
				закручивающейся зеленой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.1.6. Раствор для элюции	5 мл	1 флакон	Флакон с круглым дном из полупрозрачного бесцветного пластика, с закручивающейся крышкой, содержащий прозрачную бесцветную жидкость
	2.1.7. ДНКаз	160 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся синей крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.1.8 Буфер для ДНКаз, 10X	240 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся прозрачной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.1.9. Фильтрующие картриджи	-	2x20 картриджей	2 пакета полиэтиленовых с застёжкой Zip-Lock, каждый из которых содержит по 20 картриджей. Картридж представляет собой трубку из полупрозрачного пластика, в одном конце которой содержится фильтр белого цвета
	2.1.10 Собирающие пробирки	-	2x 40 пробирок	2 пакета полиэтиленовых с застёжкой Zip-Lock, каждый из которых содержит по 40 конических пробирок с крышкой объемом 2 мл.
	2.1.11. РНКаз А	400 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
2.2. Набор реагентов для обратной транскрипции:	2.2.1. Фермент для обратной транскрипции, 10X	100 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся черной крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.2.2. Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X	200 мкл	1 пробирка	Пробирка коническая объемом 1 мл с закручивающейся лиловой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
2.3. Набор «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек:	2.3.1. Панель «ОФ-авто» для создания ДНК-библиотек, 2X	8 x 150 мкл	8 пробирок	Пробирка коническая объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.3.2. Панель «ОФ-авто» для создания	8 x 150 мкл	8 пробирок	Пробирка коническая объемом 1,5 мл с закручивающейся белой

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
	РНК-библиотек, 2X			крышкой, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.3.3. Набор картриджей «ОФ-авто» с растворами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке). 2 шт.	-	4 картриджа	Картридж содержит 24 профольгированные лунки, из них 8 лунок объемом 5 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость объемом 4 мл и 15 лунок объемом 2 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость объемом 1,5 мл, 1 лунка объемом 2 мл (третья в первом ряду) содержит прозрачную жидкость объемом 1 мл с осадком коричневого цвета
	2.3.4. Набор картриджей «ОФ-авто» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке), 2 шт.	-	4 картриджа	Картридж содержит 20 профольгированных лунок, из них 4 лунки объемом 5 мл пустые, 15 лунок объемом 2 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость, 1 лунка (первая во втором ряду) содержит прозрачную розовую жидкость, а также и 4 лунки с вставленными пробирками: позиции А-Д: пустые прозрачные пробирки для образцов объемом 1,5 мл с закручивающимися белыми крышками.
2.3.5. Набор материалов «ОФ-авто» для станции пробоподготовки (4 набора в упаковке), 2 шт.:				
	2.3.5.1. Наконечники одноразовые «ОФ-авто» (96 шт. в штативе)	-	1 штатив	Штатив с наконечниками (96 шт., в том числе 54 наконечника объемом 1000 мкл, 40 наконечников объемом 200 мкл, 2 прокалывателя)
	2.3.5.2. Профольгированная крышка	-	1 крышка	Крышка профольгированная размером 13,3 x 9,3 см
	2.3.5.3. Штатив с пробирками для модуля обогащения	-	1 штатив	В штативе 8 пробирок объемом 1,5 мл
2.3.6. Набор баркодов «ОФ-авто» 1-32, 2 шт.:				
	2.3.6.1. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 1-8	-	1 планшет	Планшет 96-луночный из прозрачного пластика размером 12x8 см с красной полосой. 8 лунок содержат лиофилизированные баркоды 1-8.
	2.3.6.2. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов	-	1 планшет	Планшет 96-луночный из прозрачного пластика размером 12x8 см с желтой полосой. 8 лунок содержат лиофилизированные

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
	9-16			баркоды 9-16.
	2.3.6.3. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 17-24	-	1 планшет	Планшет 96-луночный из прозрачного пластика размером 12х8 см с зеленой полосой. 8 лунок содержат лиофилизированные баркоды 17-24.
	2.3.6.4. Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов 25-32	-	1 планшет	Планшет 96-луночный из прозрачного пластика размером 12х8 см с синей полосой. 8 лунок содержат лиофилизированные баркоды 25-32.
2.4. Набор для измерения концентрации библиотек:	2.4.1. Мастер-микс для кПЦР, 2X	2 x 1,25 мкл	2 пробирки	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся бесцветной крышкой с синим верхом, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.4.2. Панель для измерения концентрации библиотек, 20X	250 мкл	1 пробирка	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся бесцветной крышкой с красным верхом, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
	2.4.3. Контрольная библиотека для реакции кПЦР	2 x 2,5 мкл	2 пробирки	Пробирка с юбкой объемом 1,5 мл с закручивающейся бесцветной крышкой с желтым верхом, содержащая прозрачную бесцветную жидкость.
2.5. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке)	Полупроводниковый чип 520	-	4 чипа	Чипы, запаянные в индивидуальные фольгированные упаковки
2.6. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки, 4 шт.:	2.6.1. Планшет 96-луночный	-	1 планшет	Планшет 96-луночный из прозрачного пластика размером 12х8 см
	2.6.2. Профольгированная крышка	-	1 крышка	Крышка профольгированная размером 13,3 x 9,3 см
	2.6.3. Наконечники одноразовые	-	1 штатив	Штатив с наконечниками (96 шт., в том числе 54 наконечника объемом 1000 мкл, 40 наконечников объемом 200 мкл, 2 прокалывателя)
	2.6.4. Пробирки	-	12 пробирок	Пробирки для разбивания эмульсии объемом 2 мл
	2.6.5. Крышка для центрифуг	-	2 штуки	Крышки для центрифуг станции пробоподготовки диаметром 12 см

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
	2.6.6. Штатив с пробирками для модуля обогащения	-	1 штатив	В штативе 8 пробирок объемом 1,5 мл
	2.6.7. Адаптер для чипа		2 адаптера	Пластиковый адаптер
2.7. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке) ¹ : 	Картридж «ОФ» с растворами для амплификации и библиотек для станции пробоподготовки	-	4 картриджа	Картридж содержит 24 профольгированные лунки, из них 8 лунок объемом 5 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость объемом 4 мл и 15 лунок объемом 2 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость объемом 1,5 мл, 1 лунка объемом 2 мл (третья в первом ряду) содержит прозрачную жидкость объемом 1 мл с осадком коричневого цвета
2.8. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке) ¹ : 	Картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	-	4 картриджа	Картридж содержит 20 профольгированных лунок, из них 4 лунки объемом 5 мл пустые, 15 лунок объемом 2 мл содержат прозрачную бесцветную жидкость, 1 лунка (первая во втором ряду) содержит прозрачную розовую жидкость, а также и 4 лунки с вставленными пробирками: позиция А: пустая прозрачная пробирка для образцов объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой; позиция В: пустая прозрачная пробирка для образцов объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой; позиция С: прозрачная пробирка объемом 1,5 мл с закручивающейся красной крышкой, содержащей 2М NaOH; позиция D: пустая прозрачная пробирка объемом 1,5 мл с закручивающейся белой крышкой.
2.9. Набор растворов «ОФ» для секвенирования:	2.9.1. Промывочный раствор «ОФ»	1,5 л	4 бутылки	Бутыль из белого пластика, запаянная в фольгу, содержащая бесцветную жидкость

Компонент набора		Объем	Кол-во	Внешний вид изделия
	2.9.2. Раствор для очистки «ОФ»	250 мл	1 бутыл	Бутыл из прозрачного пластика, содержащая бесцветную жидкость
2.10. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке) ¹ : 	Картридж «ОФ» с реагентами для секвенирования	-	4 картриджа	Картридж содержит 5 лунок фиолетового, черного, синего, зеленого и красного цветов, каждая из которых сообщается с отдельной емкостью с реагентами.
* Конечный объем				
К набору реагентов прилагаются краткое руководство по применению набора и паспорт качества				

Таблица 21

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (вариант исполнения)	—	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.f-genetics.com	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в бумажном виде	1

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых и амплифицируемых баркодированных образцов должна включать отрицательные контрольные образцы. В качестве отрицательных контролей используются:

1. вода ультрачистая (контроль контаминации лаборатории).
2. стандартный образец дикого типа по потенциально выявляемым мишеням (при необходимости, контроль ложноположительных результатов секвенирования).

Отрицательные контроли тестируются, начиная с этапа таргетной амплификации как ДНК, так и РНК, и позволяют контролировать возможную контаминацию другими образцами, ампликонами или геномной ДНК. В пробирках с отрицательными контролями не должна происходить реакция амплификации (т.е. не должна детектироваться ДНК и кДНК). ДНК и кДНК детектируют с использованием ПЦР в реальном времени или с использованием анализатора NanoDrop (согласно инструкции). В случае детекции ДНК или кДНК в пробирке с отрицательным контролем (п. 1), результаты для всех пробирок с образцами в постановке считаются недостоверными, образцы бракуются. В случае детекции положительных событий в образце дикого типа на этапе секвенирования ДНК или РНК-библиотек в образце дикого типа, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, образцы бракуются.

В качестве положительного контроля используется оценка концентрации нуклеиновых кислот на этапе экстракции нуклеиновых кислот, прохождение реакции таргетной амплификации (оценка концентрации библиотек с помощью *Набора для измерения концентрации библиотек*, входящего в состав набора

реагентов). В случае если ДНК или РНК-библиотеки не детектируются с помощью заявленных методов оценки, это с высокой долей вероятности приведет к отсутствию прочтений для данных образцов в ходе секвенирования и результаты для таких образцов в постановке считаются недостоверными, образцы бракуются. Также в качестве положительного контроля детекции отклонений от референсной последовательности можно использовать стандартный образец с известными подтвержденными отклонениями. Также положительным контролем могут служить биоинформатические характеристики: количество прочтений в анализируемом образце должно быть не менее 300 000 для ДНК и 50 000 для РНК, показатель MAPD должен быть менее 0,5, равномерность покрытия и процент целевых прочтений должны составлять не менее 90%.

3.1.2. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется один раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по секвенированию последовательности генов.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с материалом, указанным в разделе «Исследуемый материал». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

4.5. Набор не позволяет выявлять отклонения от референсной последовательности, которые находятся за пределами целевых регионов/генов.

4.6. Аналитическая чувствительность теста составляет 100% (при минимальном содержании опухолевой ткани 20%). При более низком проценте опухолевых клеток вероятность детекции отклонения снижается.

4.7. Использование недостаточного количества ДНК или РНК-матрицы может привести к низкому выходу продуктов амплификации, в результате чего уровень сигнала для мутантных аллелей в ходе секвенирования может оказаться ниже предела обнаружения.

4.8. Способность анализа выявлять вариации числа копий генов (CNV) снижается в случаях с низким процентом опухолевой ткани, а химерные транскрипты - в образцах с очень низким качеством РНК.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала.

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа. Для контроля качества получаемых результатов необходимо использовать отрицательный и положительный контроли (см. п.3.1.1.).

- Лабораторный процесс должен быть односторонним. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) для пре-ПЦР и пост-ПЦР этапов инструкции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Утилизировать и дезинфицировать реагенты и образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с внутренними правилами лаборатории по утилизации и дезинфекции.

- Утилизировать неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал³, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 1.2.3685-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов (пробирок и картриджей, содержащих продукты ПЦР и секвенирования) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения исследования указанного количества образцов (см. раздел «Варианты исполнения, состав и комплектность»).

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

³ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. Входящие в состав изделия набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», картридж «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки, картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки и картридж «ОФ» с реагентами для секвенирования содержат опасные вещества, указанные в таблице 22. Заявления об опасности и меры предосторожности, требуемые при работе с данными реагентами, описаны в таблице 22. Расшифровка кодов для заявлений об опасности и мер предосторожности представлена в таблице 23.

Таблица 22

Заявления об опасности и меры предосторожности при работе с набором реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», картриджем «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки, картриджем «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки и картриджем «ОФ» с реагентами для секвенирования

Реагент	Опасные вещества	Заявления об опасности	Меры предосторожности
Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт»	трис(гидроксиметил)-аминометан, гуанидин тиоцианат и протеаза К	H302, H315, H319, H412 H302+H312+H332 H314 H334	P261, P264, P270, P273, P280, P284 P301+P310 P303 + P361 + P353 P302 + P352 P304 + P340 P305 + P351 + P338 P330 P342 + P311 P501
картридж «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки	изопропанол, децен-1, додецен-1 и трис(гидроксиметил)-аминометан	H225, H304, H315, H319, H332, H335, H336	P210, P233, P241, P242, P243, P261, P264, P270, P271, P280 P302 + P352, P321, P332 + P313, P362 + P364, P305 + P351 + P338, P337+ P313, P304 + P340, P312, P303 + P361 + P353, P370 + P378,

Реагент	Опасные вещества	Заявления об опасности	Меры предосторожности
			P304 + P340, P301 + P310, P331, P301 + P312, P330 P403 + P235, P403 + P233, P405 P501
картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	гидроксид натрия гидроксид кальция и трис (гидроксиметил)- аминометан	H290, H314, H315, H319, H335	P234, P260, P261, P264, P271, P280 P390, P302 + P352, P321, P332 + P313, P362 + P364, P305 + P351 + P338, P337+ P313, P304 + P340, P312, P301 + P330 + P331, P303 + P361 + P353, P363, P310, P321 P403 + P233, P405 P501
картридж «ОФ» с реагентами для секвенирования	гидроксид натрия и гидроксид кальция	H290, H314, H335	P260, P261, P264, P271, P280 P390, P302 + P352, P321, P332 + P313, P362 + P364, P304 + P340, P312 P403 + P233, P405 P501

Таблица 23

Заявления об опасности	
H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар H290 Может вызывать коррозию металлов H302 Вредно при проглатывании H302+H312+H332 Опасно при проглатывании, при контакте с кожей или при вдыхании H304 Может быть смертельно при проглатывании и вдыхании H314 При попадании на кожу и в глаза вызывает химические ожоги H315 Вызывает раздражение кожи H319 Вызывает серьезное раздражение глаз	H332 Наносит вред при вдыхании H334 При вдыхании может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания H335 Может вызывать раздражение дыхательных путей H336 Может вызывать сонливость или головокружение H412 Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями
Меры предосторожности	
P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить. P233: Держать крышку контейнера плотно закрытой. P234: Хранить только в контейнере завода-изготовителя. P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование. P242: Используйте только неискрящие инструменты. P243: Принимать меры предосторожности против статического разряда. P260: Не вдыхать пыль/дым/газ/туман/пары/вещество в распылённом состоянии. P261: Избегать вдыхания паров. P264: Вымойте руки после работы тщательно. P270: Не есть, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз.	P305+P351+P338: При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P310: Немедленно обратиться в токсикологический центр или к врачу. P312: Обратиться к врачу при плохом самочувствии. P321: Применение специальных мер (см. на этом маркировочном знаке). P330: Прополоскать рот. P331: Не вызывать рвоту. P332+P313: При раздражении кожи: обратиться к врачу. P337+P313: Если раздражение глаз не проходит обратиться за медицинской консультацией. P342+P311 При появлении респираторных симптомов: обратиться в токсикологический центр или к врачу-специалисту/... P362+P364: Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием. P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения.

P284 [В случае недостаточной вентиляции] пользоваться средствами защиты органов дыхания.

P301+P310: При проглатывании: Немедленно обратиться в токсикологический центр или к специалисту.

P301+P312: При проглатывании: Обратиться в токсикологический центр при плохом самочувствии.

P301+P330+P331: При проглатывании: Прополоскать рот. Не вызывать рвоту.

P302 +P352: При попадании на кожу: Промыть большим количеством воды.

P303 + P361 + P353: При попадании на кожу (или волосы): Немедленно снять всю загрязнённую одежду, промыть кожу водой/под душем.

P304+P340: При вдыхании: Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.

P390: Абсорбировать пролившееся вещество, чтобы не допустить повреждение материалов.

P403+P233: Хранить в хорошо вентилируемом месте. Держать контейнер плотно закрытым.

P403+P235: Хранить в прохладном/хорошо вентилируемом месте.

P405: Хранить в закрытом помещении.

P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

-Листы безопасности реагентов, входящих в состав набора, доступны по запросу.

-Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека. При аварийных ситуациях возможно причинение вреда при попадании на кожу и слизистую оболочку глаз, при вдыхании и при проглатывании.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Оборудование

1. Система высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics» (РУ № РЗН 2020/10521 от 22.09.21).
2. Микротом (Микротом Leica SM 2400 РУ РЗН 2014/2236 от 02.06.2015 или аналогичный) или одноразовый скальпель (РУ № ФСЗ 2010/08258 от 15.11.2016).
3. Вортекс лабораторный (Центрифуга «Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400», РУ № ФС № 2005/518, истекло 05.04.2015 или аналогичный).
4. Спектрофотометр для измерения концентрации продуктов таргетной амплификации и ДНК-библиотек (Анализатор NanoDrop 2000, номер в Госреестре СИ 56026-13, или аналогичный).
5. Термостат или инкубатор на температуры 55 °С и 95 °С (Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит», РУ № ФСР 2012/14090 от 23.11.2012г. или аналогичный) - 2 штуки.
6. Амплификатор в режиме реального времени (Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, РУ № ФСЗ 2010/06259 от 25.01.2017) и традиционный амплификатор (Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот T100 (T100 Thermal Cycler), РУ № ФСЗ 2012/12788 от 21.06.2016) или аналогичный.
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и 0,2 мл с ускорением не менее 15 500 g (Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 54xx, РУ № ФСЗ 2009/04411 от 03.06.2009).
8. Ламинарный бокс микробиологической безопасности II, тип А (Бокс микробиологической безопасности (класс II тип A2) БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5, РУ № ФСР 2010/07111 от 18.03.2010).
9. Бокс абактериальный воздушной среды (ПЦР-бокс) (Бокс абактериальной воздушной среды БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», РУ № ФСР 2012/13259 от 05.05.2012).
10. Набор автоматических дозаторов переменного объема на 1-10, 2-20, 20-200, 100-1000 мкл (Дозаторы пипеточные одно- и многоканальные «Лайт», номер в госреестре СИ 37682-13, Дозаторы пипеточные одно- и многоканальные «Техно», номер в госреестре СИ 43129-15; Дозаторы пипеточные одно- и многоканальные «Блэк», номер в госреестре СИ 41939-15).
11. Машина для производства лабораторного льда, коробка для льда или охлаждающий блок.
12. Магнитный штатив.

6.2. Материалы

13. Низкоадгезивные пробирки объемом 1,5 мл Eppendorf DNA LoBind Tubes (Пробирки DNA LoBind объемом от 0,5 до 5 мл, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009).
14. Микроцентрифужные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 1,5 мл. (Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом от 0,6 мл до 2,0 мл, РУ № ФСЗ 2009/05024 от 08.06.2018).
15. Одноразовые наконечники с фильтром объемом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл,

1000 мкл (Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем, РУ № ФСЗ 2009/05025 от 08.06.2018).

16. Безворсовая салфетка.

17. Отдельный халат (РУ № ФСЗ 2011/10269 от 13.10.2011), шапочки (РУ № ФСЗ 2008/02099 от 03.07.2008), обувь (РУ № ФСЗ 2009/05903 от 22.10.2009), маски (ФСЗ 2008/02100 от 03.07.2008) и одноразовые неопудренные нитриловые или латексные перчатки (РУ № ФСЗ 2010/07368 от 05.07.2010) в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

18. Емкость для сброса наконечников (Емкости-контейнеры для медицинских отходов классов А, Б, В, Г, РУ № ФСЗ 2010/09367 от 27.02.2014).

6.3. Реагенты

19. Этанол, 100%.

20. Ксилол, 100 %.

21. Реагент для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agenccourt AMPure XP» пр-ва Beckman Coulter S.A., США).

22. Буферный раствор LowTE (10 мМ Трис+0,1 мМ ЭДТА, pH=8,0)

23. Вода без нуклеаз или ультрачистая вода.

24. В качестве отрицательных контролей используются: 1. вода ультрачистая на этапах таргетной амплификации, подготовки библиотек и секвенирования (контроль контаминации лаборатории); 2. стандартный образец дикого типа по потенциально выявляемым мишеням (при необходимости, контроль ложноположительных результатов секвенирования).

25. В качестве положительного контроля используется оценка концентрации нуклеиновых кислот на этапе экстракции нуклеиновых кислот, прохождение реакции таргетной амплификации (оценка концентрации библиотек с помощью *Набора для измерения концентрации библиотек*, входящего в состав набора реагентов). В случае если ДНК или РНК-библиотеки не детектируются с помощью заявленных методов оценки, это с высокой долей вероятности приведет к отсутствию прочтений для данных образцов в ходе секвенирования и результаты для таких образцов в постановке считаются недостоверными, образцы бракуются.

Также в качестве положительного контроля детекции отклонений от референсной последовательности можно использовать стандартный образец с известными подтвержденными отклонениями.

Также положительным контролем могут служить биоинформатические характеристики: количество прочтений в анализируемом образце должно быть не менее 300 000 для ДНК и 50 000 для РНК, показатель MAPD должен быть менее 0,5, равномерность покрытия и процент целевых прочтений должны составлять не менее 90%.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

В качестве материала используют образцы опухолей человека, фиксированные в формалине, залитые в парафиновые блоки (FFPE), и цитологические опухолевые препараты.

Отбор материала проводится в условиях специализированного медицинского учреждения с целью получения цитологического препарата, образца биопсии или операционного материала. В операционных и манипуляционных кабинетах всегда должно быть в наличии подготовленные для взятия биопсийного материала флаконы с фиксирующей жидкостью и этикеткой для записи.

Перед началом анализа образец должен быть исследован в патоморфологической лаборатории: патоморфологи готовят предметное стекло, окрашенное гематоксилином и эозином, чтобы дать гистологическую верификацию диагноза или анализируют цитологический препарат. В ряде случаев для определения типа ткани (наличия злокачественной опухоли) требуется иммуногистохимический анализ на специфичные белки-маркеры опухоли. Кроме того, в патоморфологической лаборатории происходит оценка качества образца: подтверждение того, что срез содержит адекватное количество ткани, оценка процентного содержания опухоли ($\geq 20\%$ опухоли) и достаточно ядерных клеток, чтобы продолжить анализ. В случае, если образец преимущественно представляет собой некротическую ткань, гистологическое заключение также выносит это в описательную часть заключения.

Транспортировать и хранить образцы (FFPE) и цитологические препараты допустимо при комнатной температуре, однако хранение при $+4^{\circ}\text{C}$ повышает вероятность сохранности нуклеиновых кислот, необходимых для проведения исследования.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории⁴:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28°C;
- относительная влажность 40–75 %.

Описание рабочего процесса

Создание библиотеки	8.1 Последовательное выделение РНК и ДНК	стр. 54
	▼	
	8.2.1. Ручное создание библиотек (набор реагентов «ОнкоФокус 64»)	стр. 63
	▼	
	8.2.2. Автоматическое создание библиотек с помощью станции пробоподготовки (набор реагентов «ОнкоФокус 32 авто»)	стр. 80
	▼	
	8.3 Создание Запланированного запуска	стр. 94
	▼	
Подготовка матрицы	8.4. Запуск станции пробоподготовки. Подготовка материалов	стр. 99
	▼	
	8.4.2. Загрузка станции пробоподготовки	стр. 100
	▼	
	8.4.2.7 Запуск станции пробоподготовки	стр. 109
	▼	
	8.4.2.8 Выгрузка чипа для секвенирования	стр. 113
	▼	
Секвенирование	8.5 Инициализация секвенатора	стр. 116
	▼	
	8.5.4. Запуск процедуры секвенирования	стр. 119
	▼	
Анализ	8.7. Анализ результатов секвенирования	стр. 126

⁴ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

8.1. Последовательное выделение РНК и ДНК

Необходимые материалы

- Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт» (входит в состав набора «ОнкоФокус»);
- Микротом или одноразовый скальпель;
- Микроцентрифуга;
- Вортекс лабораторный;
- Амплификатор в режиме реального времени и традиционный амплификатор;
- Фотометр для измерения концентрации продуктов таргетной амплификации и ДНК-библиотек (Анализатор NanoDrop 2000, номер в Госреестре СИ 56026-13, или аналогичный);
- 2 термоблока с крышкой или инкубаторы, 95 °С или 55 °С;
- Кювета для гистологических стекол со съёмным штативом;
- Низкоадгезивные пробирки на 1,5 мл Eppendorf DNA LoBind Tubes;
- Набор автоматических дозаторов переменного объема на 0,1-10, 0,2-20, 20-200, 100-1000 мкл;
- Наконечники для дозатора с фильтром;
- Этанол, 100 %;
- Ксилол, 100 %.

Общие методические указания

- При работе с РНК:
 - Надевайте чистые перчатки и чистый лабораторный халат.
 - Меняйте перчатки каждый раз, когда возможен риск контаминации.
 - Открывайте и закрывайте все пробирки с образцами аккуратно. Избегайте разбрызгивания образцов.
 - Периодически мойте рабочие поверхности и оборудование средством для деконтаминации от РНКаз.
- Для элюции РНК и ДНК используйте предварительно подогретые воду без нуклеаз, буфер LowTE или раствор для элюции (входит в состав набора «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт»).
- Рекомендуется использовать воду без нуклеаз, если образцы концентрируются высушиванием после элюции, так как избыток соли может влиять на последующие процессы.

Описание протокола

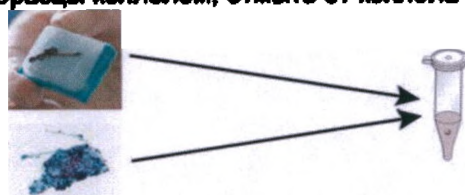
Протокол описывает последовательное выделение РНК и ДНК из одного образца. Полученные РНК и ДНК готовы к последующему использованию для количественной ПЦР в реальном времени и таргетному секвенированию.

Протокол применяется для выделения РНК и ДНК из тканей, фиксированных в формальдегиде, залитых в парафин (FFPE-образцы) и цитологических препаратов. В одной реакции может быть использовано до четырех срезов толщиной 20 мкм, оптимальный размер образца 4x4 мм.

Сначала срезы парафинового блока подвергаются депарафинизации и протеолизу. Затем образцы помещают на *Фильтрующий картридж*, который связывает ДНК, в то время как РНК фильтруется через картридж. Для выделения РНК фильтрат наносят на новый картридж, обрабатывают ДНКазой и затем элюируют РНК через фильтр. ДНК получают, смывая изначально связавшуюся ДНК с картриджа.

Шаг 1: Подготовка FFPE-образцов/цитологических препаратов

Депарафинизировать образцы ксилолом, отмыть от ксилола этанолом и высушить их.

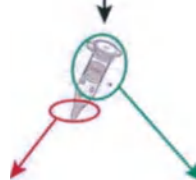


Лизировать депарафинизированные образцы *Протеазой*.
Добавить *Протеазу*, инкубировать 1 час при 55 °С, затем 1 час при 90 °С.



Шаг 2: Отделение РНК от ДНК на *Фильтрующем картридже*

Добавить *Изолирующий реагент*, нанести смесь на *Фильтрующий картридж*.

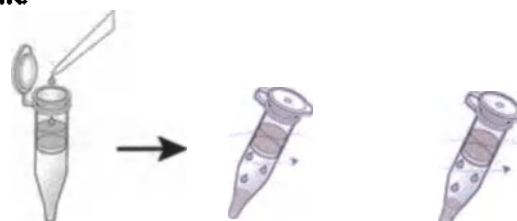


Шаг 3: Выделение РНК из смыва с *Фильтрующего картриджа*

Смешать смыв из картриджа с этанолом, нанести на *Фильтрующий картридж*, обработать ДНКазой, затем провести элюцию РНК.

Шаг 4: Выделение ДНК из *Фильтрующего картриджа*

Отмыть и элюировать ДНК.



Подготовка буферов

1. **Перед первым использованием набора: подготовка буферов**
 - Подготовка отмывочных буферов из концентратов:
 - Добавьте 42 мл 100 %-ного этанола к *Отмывочному концентрату 1*, тщательно перемешайте.
 - Добавьте 48 мл 100 %-ного этанола к *Отмывочному концентрату 2/3*, тщательно перемешайте.
 - Храните буферы при комнатной температуре
2. **Перед каждым использованием набора: подготовка *Лизирующего буфера* и нагрев *Раствора для элюции***
 - Подготовьте *Лизирующий буфер* на необходимое количество образцов с запасом в 5 % от объема.

Компонент	Объем на реакцию
Лизирующий буфер	25 мкл
Вода без нуклеаз	75 мкл
Суммарный объем	100 мкл

- Нагрейте *Раствор для элюции* до 95 °С.

Шаг 1. Подготовка образцов

А. Работа со стружкой из FFPE-образцов

- 1 Приготовление срезов из FFPE-образцов:**
- a) Используя микротом, приготовьте срезы из FFPE-образцов.
 - b) Соберите срезы в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

- 2 Депарафинизация срезов:**
- Внимание!** Ксилол – ядовитое вещество. Работайте с ним только в хорошо проветриваемых помещениях, используя средства индивидуальной защиты. Утилизируйте остатки ксилола в соответствии с нормативно-правовыми актами.

- a) Предварительно разогрейте термоблок с крышкой или инкубатор до 50 °С.
- b) Добавьте 1 мл 100 %-ного ксилола к срезам, перемешайте непродолжительным вортексированием.
- c) Сбросьте капли коротким центрифугированием. Все срезы должны быть погружены в ксилол.
- d) Нагрейте образцы при 50 °С в течение 3 минут, чтобы парафин растаял.
- e) Центрифугируйте образцы на максимальной скорости в течение 2 минут, чтобы осадить фрагменты тканей.
 - Если образец не сформировал плотный осадок, повторите центрифугирование в течение 2 минут.
 - Если плотный осадок не образовался, выполните следующий шаг с осторожностью.
- f) Удалить ксилол.

Примечание: если осадок рыхлый, оставьте 50-100 мкл ксилола в пробирке, чтобы не удалить фрагменты ткани. Как правило, ткань прозрачна и может быть трудно различима в пробирке.

- 3 Двойная отмывка этанолом:**
- Внимание!** Удаляемый этанол содержит следы ксилола и должен быть утилизирован в соответствии с нормативно-правовыми актами.

- a) Добавьте 1 мл 100 %-ного этанола к осажженным тканям и провортексируйте. Ткань должна стать прозрачной.
- b) Центрифугируйте образец на максимальной скорости в течение 2 минут.
- c) Удалите максимальное количество этанола, без повреждения образца.
- d) Повторите шаги 3а-3в для повторной отмывки образца этанолом, чтобы полностью удалить ксилол.

Важно! Пропустите вторую отмывку при работе с небольшими образцами, так как избыточное промывание может привести к потере образца.

- 4 Высушите осадок:**
- Время высушивания варьируется в зависимости от количества этанола. Высушите осадок одним из следующих способов:

- С помощью центрифужного вакуумного концентратора, используя один из представленных ниже режимов:

Температура	Время
40–45°С	<20 мин

37–40°C

20–40 мин

- Высушите на воздухе при комнатной температуре в течение 15–45 минут.

ВНИМАНИЕ! Высушенные образцы можно хранить при комнатной температуре до 72 часов.

5 Обработка протеазой:

- Добавьте к каждому образцу 100 мкл разведенного *Лизирующего буфера* (см. «Перед каждым использованием набора: подготовка *Лизирующего буфера* и нагрев *Раствора для элюции*») и 4 мкл *Протеазы*.
- Аккуратно встряхните пробирку, чтобы перемешать содержимое и погрузить ткань в раствор.
- Если ткань прилипает к стенкам пробирки, используйте наконечник пипетки или быстро отцентрифугируйте, чтобы поместить ткань в раствор.
- Инкубируйте при 55°C в течение 1 часа, затем быстро отцентрифугируйте, чтобы собрать капли конденсата.
- Инкубируйте при 90°C в течение 1 часа, затем быстро отцентрифугируйте, чтобы собрать капли конденсата.

Шаг 1. Подготовка образцов

Б. Работа с цитологическими препаратами

1 Удалите парафин из участков цитологического препарата:

Внимание! Ксилол – ядовитое вещество. Работайте с ним только в хорошо проветриваемых помещениях, используя средства индивидуальной защиты. Утилизируйте остатки ксилола в соответствии с нормативно-правовыми актами.

- Погрузите предметные стекла в 100%-ный ксилол на 5 минут.
- Вытащите слайды, затем слейте лишний ксилол, наклонив держатель слайдов.
- Погрузите слайды в 100%-ный этанол на 5 минут.
- Вытащите слайды, затем слейте избыток этанола, наклонив держатель слайдов.
- Высушите слайды на воздухе в течение 15 минут.

2 Обработка протеазой:

- Добавьте 100 мкл разведенного *Лизирующего буфера* в стерильную пробирку объемом 1,5 мл.
- Добавьте 2–4 мкл разведенного *Лизирующего буфера*, в зависимости от размера ткани, равномерно распределяя жидкость по предметному стеклу гистологического среза для предварительного смачивания образца.

Примечание: Вы можете оптимизировать объем *Лизирующего буфера*, в зависимости от размера ткани.

- Очистите срезы ткани в одном направлении чистым лезвием или скальпелем, затем соберите ткань на предметном стекле в целостную массу.
- Перенесите тканевую массу в пробирку с разведенным *Лизирующим буфером* с

- помощью скальпеля или наконечника пипетки.
- Добавьте 4 мкл *Протеазы* в каждый образец.
 - Аккуратно встряхните пробирку, чтобы перемешать содержимое и погрузить ткань в раствор.
 - Если ткань прилипает к стенкам пробирки, используйте наконечник пипетки или быстро отцентрифугируйте, чтобы поместить ткань в раствор.
 - Инкубируйте при 55°C в течение 1 часа, затем быстро отцентрифугируйте, чтобы собрать капли конденсата.
 - Инкубируйте при 90°C в течение 1 часа, затем быстро отцентрифугируйте, чтобы собрать капли конденсата.

Шаг 2: Отделение РНК от ДНК на *Фильтрующем картридже*

- Пропустите каждый образец через *фильтрующий картридж*, при этом сохраните как картридж, так и жидкость, пропущенную через него
 - Добавьте 120 мкл *Изолирующего реагента* к образцу и пипетируйте, он станет слегка мутным.
 - Поместите образец в *Фильтрующий картридж* и закройте крышку.
 - Центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд.
 - Поместите *Фильтрующий картридж* в новую *Собирающую пробирку* и храните при комнатной температуре, на льду или при 4°C для очистки ДНК на последующих этапах («Шаг 4: Выделение ДНК из *Фильтрующего картриджа*»).
 - Перейдите к выделению РНК из фильтрата с картриджа («Шаг 3: Выделение РНК из фильтрата из *Фильтрующего картриджа*»).

Шаг 3: Выделение РНК из фильтрата из *Фильтрующего картриджа*

- Поместите фильтрат на новый *фильтрующий картридж*
 - Добавьте 1,25 объема (обычно 275 мкл) 100% этанола к фильтрату из «Шага 2: Отделение РНК от ДНК на *Фильтрующем картридже*».
 - Хорошо перемешайте с помощью пипетирования и перенесите образец на новый *Фильтрующий картридж*.
 - Центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд.
 - Удалите фильтрат и снова вставьте *Фильтрующий картридж* в ту же *Собирающую пробирку*.
- Отмойте РНК, связавшуюся с *фильтрующим картриджем*
 - Добавьте 600 мкл *Отмывочного буфера 1* на *Фильтрующий картридж*.
 - Центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд.
 - Удалите фильтрат и снова вставьте *Фильтрующий картридж* в ту же *Собирающую пробирку*.
 - Центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд, чтобы удалить остаточную жидкость.
- Обработайте РНК на *фильтрующем картридже* с

Компонент	Объем на картридж

помощью ДНКазы	ДНКаз	4 мкл
	Буфер для ДНКаз, 10X	6 мкл
	Вода без нуклеаз	50 мкл
	Общий объем ДНКазной смеси	60 мкл
	b) Добавьте 60 мкл ДНКазной смеси в центр каждого <i>Фильтрующего картриджа</i> .	
	c) Инкубируйте при комнатной температуре 15–30 минут.	
4 Отмойте РНК, связанную с фильтрующим картриджем	a)	Добавьте 600 мкл <i>Отмывочного буфера 1</i> на <i>фильтрующий картридж</i> .
	b)	Инкубируйте в течение 30–60 секунд при комнатной температуре, затем центрифугируйте при 10000 × g в течение 30 секунд.
	c)	Удалите фильтрат и снова вставьте <i>Фильтрующий картридж</i> в ту же <i>Собирающую пробирку</i> .
	d)	Добавьте 500 мкл <i>Отмывочного буфера 2/3</i> на <i>Фильтрующий картридж</i> и центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд.
	e)	Удалите отфильтрованную жидкую часть и снова вставьте <i>Фильтрующий картридж</i> в ту же <i>Собирающую пробирку</i> .
	f)	Выполните вторую отмывку с помощью <i>Отмывочного буфера 2/3</i> , повторив шаги 4d и 4e.
	g)	Центрифугируйте на максимальной скорости в течение 2 минут, чтобы удалить остаточную жидкость и перенесите <i>Фильтрующий картридж</i> в новую низкоадгезивную пробирку.
5 Элюируйте РНК	a)	Смочите наконечник пипетки 3 раза нагретым <i>Раствором для элюции</i> .
	b)	Добавьте 30-50 мкл нагретого <i>Раствора для элюции</i> в центр <i>фильтрующего картриджа</i> .
	c)	Инкубируйте в течение 1 минуты при комнатной температуре, затем центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 минуты.
	d)	(Опционально) Повторите шаги 5a-5c, чтобы выполнить вторую элюцию. Это позволит увеличить выход, но приведет к снижению концентрации РНК.
	e)	Удалите <i>Фильтрующий картридж</i> и храните выделенную РНК в низкоадгезивной пробирке при температуре –20°C или –80°C.
Шаг 4: Выделение ДНК из <i>Фильтрующего картриджа</i>		
1 Отмойте ДНК, связанную с фильтрующим картриджем	a)	Добавьте 600 мкл <i>Отмывочного буфера 1</i> на <i>Фильтрующий картридж</i> из «Шага 2: Отделение РНК от ДНК на <i>Фильтрующем картридже</i> ».
	b)	Центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд.
	c)	Удалите фильтрат и снова вставьте <i>фильтрующий картридж</i> в ту же <i>Собирающую пробирку</i> .
	d)	Добавьте 500 мкл <i>Отмывочного буфера 2/3</i> на <i>Фильтрующий картридж</i> и центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд.
	e)	Удалите фильтрат и снова вставьте

	<i>Фильтрующий картридж в ту же Собирающую пробирку.</i>
2 Отмойте ДНК, связанную с фильтрующим картриджем	Добавьте 500 мкл <i>Отмывочного буфера 2/3</i> на <i>Фильтрующий картридж</i> и центрифугируйте при 10000×g в течение 30 секунд. Удалите фильтрат и снова вставьте <i>Фильтрующий картридж</i> в ту же <i>Собирающую пробирку</i>. Центрифугируйте на максимальной скорости в течение 2 минут, чтобы удалить остаточную жидкость и перенесите <i>Фильтрующий картридж</i> в новую <i>низкоадгезивную пробирку</i>.
3 Элюция ДНК	a) Смочите наконечник пипетки 3 раза нагретым <i>Раствором для элюции</i>. b) Добавьте 30-50 мкл нагретого <i>Раствора для элюции</i> в центр <i>Фильтрующего картриджа</i>. c) Инкубируйте в течение 1 минуты при комнатной температуре, затем центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 минуты. d) (Опционально) Повторите шаги 3a-3c, чтобы выполнить вторую элюцию. Это позволит увеличить выход, но приведет к снижению концентрации ДНК. e) Удалите <i>Фильтрующий картридж</i> и храните выделенную ДНК в <i>низкоадгезивной пробирке</i> при температуре –20°C или –80°C.

8.1.1 Оценка концентрации выделенных нуклеиновых кислот

8.1.1.1. Оценка концентрации выделенной РНК

**Общие
методические
указания для
выделения и
оценки
концентрации РНК**

- Для оценки концентрации выделенной РНК рекомендуется использовать спектрофотометр «NanoDrop 2000».
- Для каждой реакции обратной транскрипции требуется 10 нг ($\geq 1,43$ нг/мкл) тотальной РНК, обработанной ДНКазой.
- Как правило, концентрация библиотек из РНК высокого качества получается выше, чем из деградировавших образцов. Концентрация библиотеки не отражает качество последующего секвенирования.
- Увеличение количества РНК обычно приводит к получению библиотек более высокого качества, особенно в тех случаях, когда качество или количество РНК неизвестны. Допускается использовать 1 нг тотальной РНК только для образцов хорошего качества с достоверно измеренной концентрацией.

Перед началом измерения выберите «RNA-40» и единицы измерения «ng/ul». Добавьте 1 мкл воды без нуклеаз на специальную подложку прибора для разовой калибровки (установления нулевого значения). Опустите плечо прибора и нажмите кнопку «Blank». После этого протрите каплю чистой сухой, безворсовой лабораторной салфеткой. Прделайте эту процедуру еще один раз. Осторожно провортексируйте/перемешайте пипеткой пробирку с выделенной РНК. Затем нанесите 1 мкл выделенной РНК образца на специальную подложку прибора, закройте плечо прибора и нажмите «Measure». Протрите измерительную подложку и подвижное плечо с помощью сухой, безворсовой лабораторной салфетки, и измерьте следующий образец.

С помощью программного обеспечения к прибору после измерения выдается график измерения и концентрация, основанная на поглощении при длине волны 260 нм. Также программное обеспечение прибора выдает значение 260/280, которое является коэффициентом поглощения при 260 нм и 280 нм. Для РНК пороговое значение коэффициента обычно 2.0.

Зафиксируйте получившиеся результаты.

8.1.1.2. Оценка концентрации выделенной ДНК

**Общие
методические
указания для
выделения и оценки
концентрации ДНК**

- Для оценки концентрации выделенной ДНК рекомендуется использовать спектрофотометр «NanoDrop 2000».
- Для каждой реакции таргетной амплификации используйте 300-30,000 копий ДНК (10 нг ДНК, $\geq 0,83$ нг/мкл).
- Увеличение количества ДНК позволяет получить библиотеки более высокого качества, особенно в тех случаях, когда качество или количество ДНК неизвестны. Рекомендуется использовать 1 нг ДНК (300 копий) только для образцов хорошего качества с достоверно измеренной концентрацией.

Перед началом измерения выберите «DNA-50» и единицы измерения «ng/ul». Добавьте 1 мкл воды без нуклеаз на специальную подложку прибора для разовой

калибровки (установления нулевого значения). Опустите плечо прибора и нажмите кнопку «Blank». После этого протрите каплю чистой сухой, безворсовой лабораторной салфеткой. Провортексируйте/перемешайте пипеткой пробирку с выделенной ДНК. Затем нанесите 1 мкл выделенной ДНК образца на специальную подложку прибора, закройте плечо прибора и нажмите «Measure». Протрите измерительную подложку и подвижное плечо с помощью сухой, безворсовой лабораторной салфетки, и измерьте следующий образец.

С помощью программного обеспечения к прибору после измерения выдается график измерения и концентрация, основанная на поглощении при длине волны 260 нм. Также программное обеспечение прибора выдает значение 260/280, которое является коэффициентом поглощения при 260 нм и 280 нм. Для ДНК пороговое значение коэффициента обычно 1.8.

Зафиксируйте получившиеся результаты.

8.2. Создание библиотек

8.2.1. Ручное создание библиотек (набор реагентов «ОнкоФокус 64»)

Необходимые материалы

- Набор «ОФ» для ручного создания библиотек (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Набор реагентов для обратной транскрипции (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Набор баркодов 1-16 (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Набор для измерения концентрации библиотек (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Реагент для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («AgenCourt AMPure XP»)
- Термоциклер
- Планшеты, пленки, магнитный штатив
- Автоматический дозатор переменного объема на 2-200 мкл с наконечниками с фильтром
- Вода без нуклеаз
- Этанол, 70%

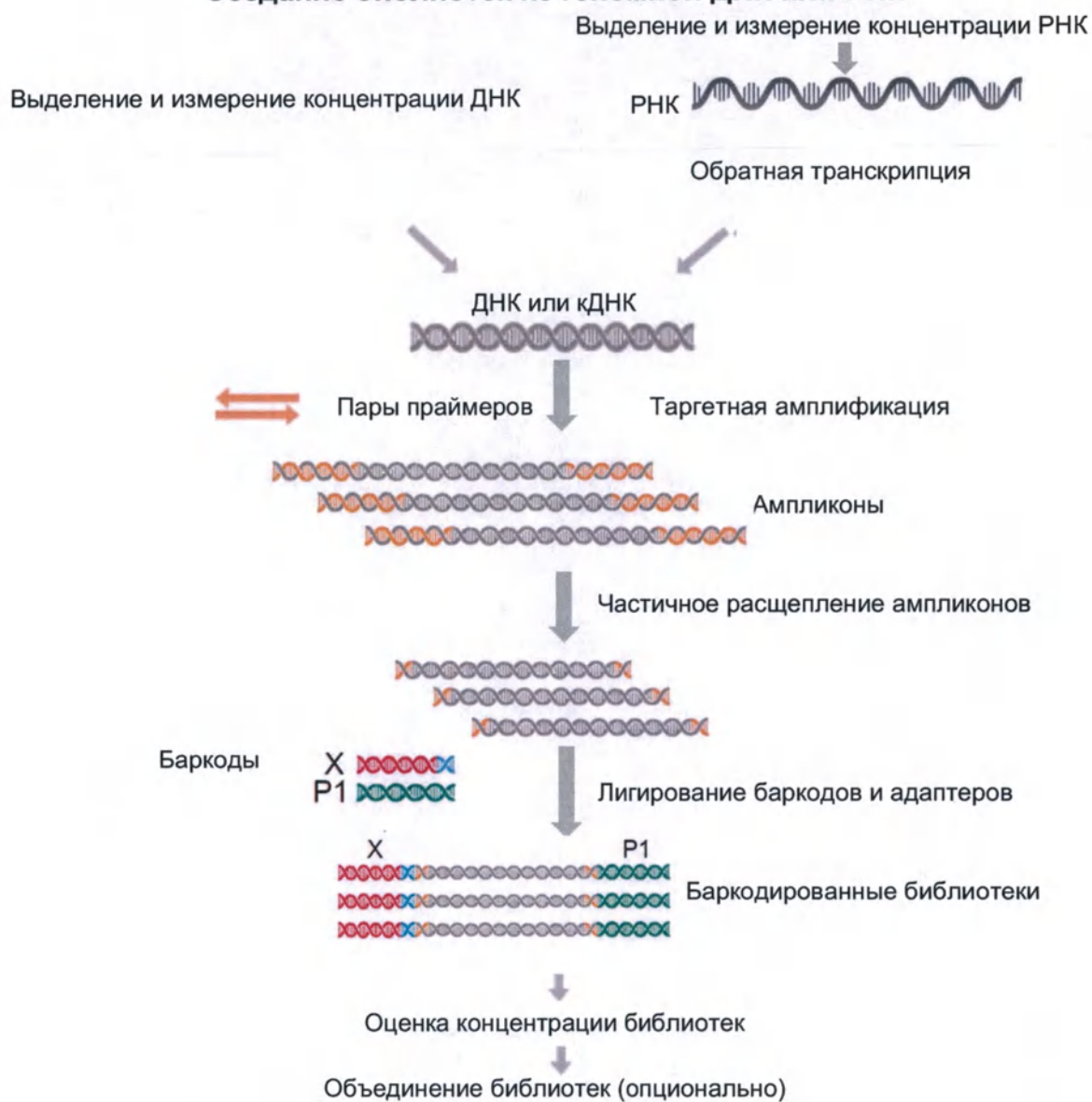
Методические рекомендации

- Избегайте многократного замораживания-оттаивания панелей «ОФ» для создания библиотек, подготовив необходимые аликвоты для постановок. Панели могут храниться при 4 °С в течение года.
- Вязкие растворы, такие как *Фермент для создания библиотек*, *5X*, *Фермент для частичного расщепления ампликонов*, *Стоп-раствор*, *ДНК-лигаза* и *Панели* набирайте в наконечник дозатора медленно, тщательно перемешивайте их вортиксованием, либо многократным пипетированием.
- Располагайте образцы в столбцах планшета, оставляя пустые столбцы между ними, для работы многоканальным дозатором во время очистки на магнитном штативе.

Перед началом работы

- Компоненты, содержащие фермент, такие как *Фермент для создания библиотек, 5X*, *Фермент для частичного расщепления ампликонов, ДНК-лигаза*, *Фермент для обратной транскрипции, 10X* и *Набор для ПЦР-обогащения библиотек*, размораживайте на льду и держите на льду либо в холодном штативе во время работы с реагентом. Все остальные компоненты (*Панель «ОФ» для создания ДНК-библиотек, 5X*, *Панель «ОФ» для создания РНК-библиотек*, *Праймеры для амплификации библиотек*) могут быть разморожены при комнатной температуре. Перед использованием реагентов перемешайте их мягким вортиксированием и сбросьте капли.
- Если в *Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X* или *Стоп-растворе* после оттаивания наблюдается заметный осадок, провортиксируйте или тщательно пропипетируйте их при комнатной температуре.

Создание библиотек из геномной ДНК или РНК



8.2.1.1. РНК: Обратная транскрипция и таргетная амплификация

8.2.1.1.1. Обратная транскрипция РНК

Прогрейте образец РНК, полученный из образцов, при 80 °С в течение 10 минут, затем остудите до комнатной температуры.

Примечание: Рекомендуется подготавливать ПЦР смесь на льду либо на холодном штативе.

ВАЖНО! Если в *Мастер-миксе для обратной транскрипции, 5X* наблюдается заметный осадок, провортексируйте или тщательно пропипетируйте его, убедитесь, что осадок не остался на крышке пробирки

8.2.1.1.1.1. Для каждого образца в лунку 96-луночного ПЦР-планшета добавьте компоненты в соответствии с таблицей ниже. При работе с несколькими образцами приготовьте мастер-микс без РНК.

Компонент	Объем на одну реакцию
<i>Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X</i>	2 мкл
<i>Фермент для обратной транскрипции, 10X</i>	1 мкл
Тотальная РНК (10 нг) ^[1]	≤ 7 мкл
Вода без нуклеаз	до 10 мкл
Общий объем	10 мкл

^[1] Для приготовления отрицательного контроля используйте соответствующий объем воды без нуклеаз или буфера LowTE.

8.2.1.1.1.2. Запечатйте планшет пленкой, тщательно провортексируйте, затем сбросьте капли центрифугированием при 100 × g в течение 30 секунд.

8.2.1.1.1.3. Поставьте планшет в термоциклер и запустите программу синтеза кДНК по следующему протоколу:

Температура	Время
42 °С	30 минут
85 °С	5 минут
10 °С	∞

Внимание! Образцы могут храниться при 10 °С в течение ночи (12-16 часов) в термоциклере. Для более длительного хранения поместите образцы на –20 °С.

8.2.1.1.1.4. Центрифугируйте планшет при 100 × g в течение 30 секунд.

8.2.1.1.2. Подготовка таргетной амплификации кДНК

ВАЖНО! *Панели* и *Фермент для создания библиотек, 5X* – вязкие. Набирайте их в наконечник дозатора медленно и тщательно перемешивайте.

8.2.1.1.2.1. Поместите планшет с образцами в заранее охлажденный блок или на лед.

8.2.1.1.2.2. Разморозьте *Фермент для создания библиотек, 5X* на льду, слегка провортексируйте и непродолжительно отцентрифугируйте, чтобы собрать капли.

8.2.1.1.2.3. Удалите пленку с планшета и добавьте следующие компоненты в каждую лунку. При работе с несколькими образцами приготовьте мастер-микс.

Компонент	Объем на одну реакцию
Фермент для создания библиотек, 5X (красная крышка)	4 мкл
Панель «ОФ» для создания РНК-библиотек, 5X ^[1]	2 мкл
Вода без нуклеаз	4 мкл
Общий объем (включая 10 мкл кДНК)	20 мкл

^[1] Итоговая концентрация в растворе составляет 0,5X

8.2.1.1.2.4. Запечатайте планшет пленкой, тщательно провортексируйте и коротко отцентрифугируйте, чтобы сбросить капли. Также можно перемешать образец пятикратным пипетированием половинного объема.

8.2.1.1.3. Таргетная амплификация кДНК

8.2.1.1.3.1. Поставьте планшет в термоциклер.

8.2.1.1.3.2. Запустите программу таргетной амплификации по следующему протоколу:

Фаза	Этап	Температура	Время
Удержание	Активация фермента	98 °C	2 минуты
Цикл; установите количество в соответствии с таблицей ниже	Денатурация	98 °C	15 секунд
	Отжиг и элонгация	60 °C	4 минуты
Удержание	—	10 °C	∞

Исходная нуклеиновая кислота ^[1]	Рекомендуемое количество циклов (10 нг)	Изменение количества циклов ^[2]	
		Исходно 1 нг РНК	Исходно 100 нг РНК
РНК высокого качества	27	+3	–3
РНК из FFPE-блоков	30	+3	–3

^[1] Количество циклов может быть увеличено, если качество или количество материала сомнительно.

^[2] Рекомендуемое количество циклов указано для 10 нг исходной РНК. Измените количество циклов для большего или меньшего количества исходной РНК.

ВАЖНО! При амплификации нескольких образцов в одном ПЦР-планшете убедитесь, что количество исходной РНК для всех образцов приблизительно одинаковое, чтобы выбранное количество циклов было оптимальным для всех образцов в постановке.

Внимание! Образцы могут храниться при 10 °C в течение ночи в термоциклере. Для более длительного хранения поместите образцы на –20 °C.

8.2.1.2. Таргетная амплификация ДНК

8.2.1.2.1. Подготовка таргетной амплификации ДНК

ВАЖНО! Панели и Фермент для создания библиотек, 5X – вязкие. Набирайте их в наконечник дозатора медленно и тщательно перемешивайте.

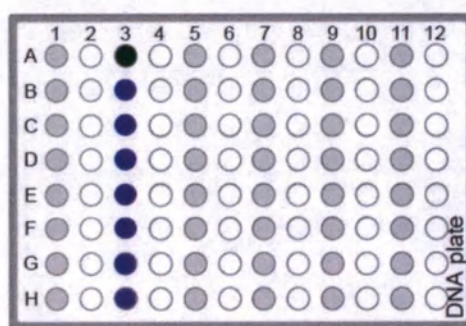
8.2.1.2.1.1. Поместите планшет с образцами в заранее охлажденный блок или на лед.

8.2.1.2.1.2. Разморозьте Фермент для создания библиотек, 5X на льду, слегка провортексируйте и непродолжительно отцентрифугируйте, чтобы собрать капли.

8.2.1.2.1.3. Добавьте следующие компоненты в каждую лунку. При работе с несколькими образцами приготовьте мастер-микс без ДНК.

Компонент	Объем на одну реакцию
Фермент для создания библиотек, 5X (красная крышка)	4 мкл
Панель «ОФ» для создания ДНК-библиотек, 5X	2 мкл
ДНК (10 нг) ^[1]	≤ 12 мкл
Вода без нуклеаз	до 20 мкл

^[1] Для приготовления отрицательного контроля используйте соответствующий объем воды без нуклеаз или буфера LowTE.



- Образец ДНК для таргетной амплификации
- Отрицательный контроль таргетной амплификации

8.2.1.2.1.4. Запечатайте планшет пленкой.

8.2.1.2.1.5. Провортексируйте планшет 5 секунд и непродолжительно отцентрифугируйте, чтобы сбросить капли. Также можно перемешать образец пятикратным пипетированием половинного объема.

8.2.1.2.2. Таргетная амплификация ДНК

8.2.1.2.2.1. Поставьте планшет в термоциклер.

8.2.1.2.2.2. Запустите программу таргетной амплификации по следующему протоколу:

Фаза	Этап	Температура	Время
Удержание	Активация фермента	99 °C	2 минуты
Цикл; установите количество в соответствии с таблицей ниже	Денатурация	99 °C	15 секунд
	Отжиг и элонгация	60 °C	4 минуты
Удержание	—	10 °C	∞

Исходная нуклеиновая кислота ^[1]	Рекомендуемое количество циклов (10 нг)	Изменение количества циклов ^[2]	
		Исходно 1 нг ДНК	Исходно 100 нг ДНК
ДНК высокого качества	17	+3	-3
ДНК из FFPE-блоков	20	+3	-3

[1] Количество циклов может быть увеличено, если качество или количество материала сомнительно.

[2] Рекомендуемое количество циклов указано для 10 нг исходной ДНК. Измените количество циклов для большего или меньшего количества исходной ДНК.

ВАЖНО! При амплификации нескольких образцов в одном ПЦР-планшете убедитесь, что количество исходной ДНК для всех образцов приблизительно одинаковое, чтобы выбранное количество циклов было оптимальным для всех образцов в постановке.

Внимание! Образцы могут храниться при 10 °С в течение ночи в термоциклере. Для более длительного хранения поместите образцы на -20 °С.

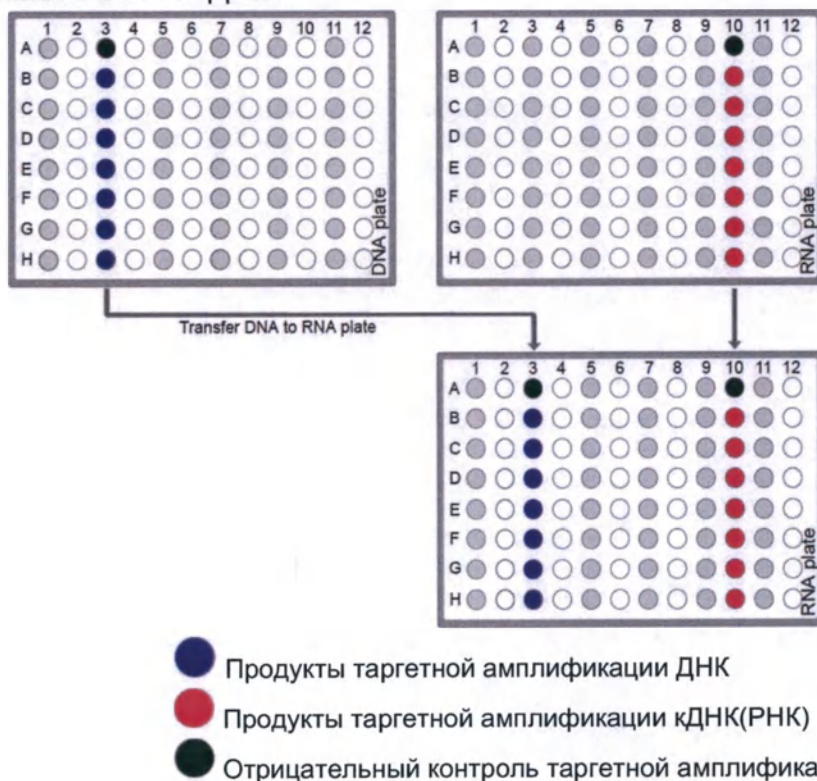
8.2.1.2.3. Перемещение продукта амплификации ДНК

8.2.1.2.3.1. Снимите планшет с термоциклера и непродолжительно отцентрифугируйте её, чтобы собрать капли.

8.2.1.2.3.2. Аккуратно снимите пленку с планшета.

ВАЖНО! Будьте осторожны при удалении пленки, чтобы минимизировать риск контаминации.

8.2.1.2.3.3. Перенесите продукты амплификации ДНК в соответствующие пустые лунки на планшете с РНК/кДНК.



8.2.1.3. Частичное расщепление ампликонов

8.2.1.3.1. Разморозьте на льду *Фермент* для *частичного расщепления ампликонов* (коричневая крышка), слегка перемешайте на вортексе, затем непродолжительно отцентрифугируйте, чтобы собрать капли.

8.2.1.3.2. Добавьте 2 мкл *Фермента* для *частичного расщепления ампликонов* к каждому образцу. Общий объем составляет примерно 22 мкл.

8.2.1.3.3. Запечатйте планшет прозрачной пленкой, тщательно перемешайте вортексированием и непродолжительно отцентрифугируйте, чтобы собрать капли. Также можно перемешать образец пятикратным пипетированием половинного объема.

8.2.1.3.4. Поставьте планшет в термоциклер. Запустите программу по следующему протоколу:

Температура	Время
50 °C	10 минут
55 °C	10 минут
60 °C	20 минут
10 °C	∞ (до 1 часа)

8.2.1.3.5. Сбросьте капли центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! Для длительного хранения поместите образцы на –20 °C.

8.2.1.4. Лигирование баркодов

Для секвенирования библиотек нескольких образцов на одном чипе, **необходимо** использовать разные баркоды для каждого образца. ДНК и РНК библиотеки для одного образца так же должны иметь различные баркоды.

Баркоды требуют дополнительного разведения, как описано ниже.

ВАЖНО! При работе с баркодами избегайте кросс-контаминации, часто меняйте перчатки и не открывайте несколько пробирок одновременно.

8.2.1.4.1. Объединение и разведение баркодов

Для каждого выбранного баркода X подготовьте смесь *Адаптера для библиотек* и *Баркода X*^[1] в конечном разведении 1:4 для каждого баркода. Например, смешайте компоненты в соответствии с таблицей ниже. Масштабируйте объемы, если необходимо. Используйте 2 мкл этой смеси в п. 8.2.1.4.2.3 ниже.

Компонент	Объем на одну реакцию
<i>Адаптер для библиотек</i>	2 мкл
<i>Баркод X</i> ^[1]	2 мкл
Вода без нуклеаз	4 мкл
Общий объем	8 мкл

^[1] X = выбранный баркод

Примечание: храните разведенные адаптеры при –20 °C.

8.2.1.4.2. Лигирование баркодов

8.2.1.4.2.1. Если в *Стоп-растворе* после оттаивания в пробирке или на крышке наблюдается заметный осадок, провортексируйте или тщательно пропипетируйте его при комнатной температуре.

8.2.1.4.2.2. Коротко отцентрифугируйте планшет с образцами, чтобы собрать капли.

8.2.1.4.2.3. Аккуратно снимите пленку с планшета, затем добавьте компоненты в порядке, указанном ниже. При работе с несколькими образцами можно смешать *Стоп-раствор* и баркоды.

ВАЖНО! Добавляйте ДНК-лигазу в последнюю очередь. Не объединяйте ДНК-лигазу и баркоды до добавления частично расщепленных ампликонов.

Порядок добавления	Компонент	Объем на реакцию
1	<i>Стоп-раствор</i> (желтая крышка)	4 мкл
2	Разведенные баркоды	2 мкл
3	<i>ДНК-лигаза</i> (синяя крышка)	2 мкл
Общий объем (включая 22 мкл частично расщепленных ампликонов):		~30 мкл

8.2.1.4.2.4. Запечатйте планшет пленкой, тщательно перемешайте вортиксированием и непродолжительно отцентрифугируйте, чтобы собрать капли. Также можно перемешать образец пятикратным пипетированием половинного объема.

8.2.1.4.2.5. Поставьте планшет в термоциклер. Запустите программу по следующему протоколу:

Температура	Время
22 °C	30 минут
68 °C	5 минут
72 °C	5 минут
10 °C	∞ (до 24 часов)

Внимание! Образцы могут храниться при 10 °C в течение 24 часов в термоциклере. Для более длительного хранения поместите образцы на –20 °C.

8.2.1.5. Очистка библиотек

ВАЖНО! Заранее достаньте магнитные частицы «Agencourt AMPure XP Reagent», чтобы они были комнатной температуры. Тщательно провортиксируйте частицы перед использованием. Медленно набирайте раствор в наконечник дозатора.

8.2.1.5.1. Подготовьте свежий 70 % этанол (350 мкл на образец).

8.2.1.5.2. Кратко отцентрифугируйте планшет, чтобы собрать капли.

8.2.1.5.3. Аккуратно снимите пленку с планшета, добавьте к каждому образцу 45 мкл (1,5X объем образца) магнитных частиц «Agencourt AMPure XP Reagent». Перемешайте смесь пятикратным пипетированием.

Примечание: визуально проверьте, что смесь гомогенная.

8.2.1.5.4. Инкубируйте смесь 5 минут при комнатной температуре.

8.2.1.5.5. Поставьте планшет на магнитный штатив, инкубируйте 2 минуты, пока раствор не станет прозрачным. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок.

8.2.1.5.6. Добавьте 150 мкл свежеприготовленного 70 % этанола, затем переместите планшет со сдвигом на 1 ряд туда и обратно, чтобы промыть частицы. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок.

Примечание: если у магнитного штатива нет двух позиций для промывки частиц, снимите планшет с магнита и аккуратно пропипетируйте 5 раз объемом 100 мкл, затем поместите планшет обратно на магнитный штатив и инкубируйте 2 минуты, пока раствор не станет прозрачным.

8.2.1.5.7. Повторите пункт 8.2.1.5.6 для повторной отмывки.

8.2.1.5.8. Убедитесь, что все капли спирта удалены. Оставляя открытую планшет на магнитном штативе, высушите магнитный осадок при комнатной температуре в течение 2-5 минут. Не пересушивайте осадок.

ВАЖНО! Остаточные капли этанола ингибируют амплификацию библиотек. Если необходимо, отцентрифугируйте планшет и удалите оставшиеся капли спирта перед высушиванием осадка. В условиях низкой влажности частицы высыхают быстрее. Не пересушивайте осадок.

8.2.1.5.1. Элюция библиотеки

8.2.1.5.1.1. Снимите планшет с очищенными библиотеками с магнитного штатива, добавьте 50 мкл буфера lowTE к осадку, чтобы растворить его.

8.2.1.5.1.2. Запечатйте планшет пленкой, тщательно перемешайте вортиксированием и коротко отцентрифугируйте, чтобы собрать капли. Также можно перемешать образец пятикратным пипетированием половинного объема.

8.2.1.5.1.3. Инкубируйте образцы при комнатной температуре не менее 2 минут.

8.2.1.5.1.4. Поставьте планшет на магнитный штатив на 2 минуты.

Внимание! Образцы могут храниться при 4-8 °C в течение 1 месяца. Для более длительного хранения поместите образцы на -20 °C. Рекомендуется перенести супернатант в низкоадгезивные пробирки для длительного хранения.

8.2.1.5.1.5. Перенесите 48 мкл супернатанта, содержащего очищенную библиотеку в новую пробирку.

8.2.1.5.1.6. Подготовьте 100-кратное разведение для оценки концентрации. Возьмите 2 мкл супернатанта, содержащего библиотеку и разведите в 198 мкл воды без нуклеаз.

8.2.1.5.1.7. Храните на +4 °C очищенную библиотеку, пока измеряете концентрацию библиотек.

8.2.1.5.2. Измерение концентрации библиотеки методом qPCR и вычисление коэффициента разведения

Для определения концентрации каждой библиотеки методом qPCR используйте *Набор для измерения концентрации библиотек*. Анализируйте каждый образец, стандарт и отрицательный контроль в трех повторностях. Библиотеки, не прошедшие второй раунд амплификации, как правило, показывают концентрацию 100–500 pM. В таких случаях получение данных секвенирования маловероятно, но не исключено, так как концентрация не всегда отражает качество библиотеки. После определения концентрации и коэффициента разведения, разведите все библиотеки до концентрации 50 pM.

8.2.1.5.2.1. Подготовьте тройную серию 10-кратных разведений *контрольной библиотеки для реакции кПЦР* (~68 pM; из *Набора для измерения концентрации*

библиотек), с концентрациями 6,8 pM, 0,68 pM, и 0,068 pM. Промаркируйте эти пробирки как стандарты, используя известные концентрации в программном обеспечении прибора qPCR.

Стандарт	Контрольная библиотека	Вода без нуклеаз	Коэффициент разведения	Концентрация
1	5 мкл неразведенной контрольной библиотеки	45 мкл	1:10	6,8 pM
2	5 мкл стандарта 1	45 мкл	1:100	0,68 pM
3	5 мкл стандарта 2	45 мкл	1:1000	0,068 pM

Примечание: при задании программы для qPCR, вводите концентрацию каждого стандарта в поле «Количество».

8.2.1.5.2.2. Рассчитайте и приготовьте необходимое количество мастер-микса для ПЦР с учетом трех повторностей каждой библиотеки, стандарта и отрицательного контроля, используя таблицу ниже. Добавьте 5-10 % объема с запасом, чтобы учесть погрешности пипетирования.

Компонент	Объем на одну реакцию	
	96-луночный планшет	384-луночный планшет
Мастер-микс для кПЦР, 2X	10 мкл	5 мкл
Панель для измерения концентрации библиотек, 20X	1 мкл	0,5 мкл
Общий объем	11 мкл	5,5 мкл

8.2.1.5.2.3. В оптически прозрачный ПЦР планшет нанесите смесь для реакции для каждого образца, стандарта и отрицательного контроля в трех повторностях. В каждую лунку добавьте следующие компоненты:

Компонент	Объем на одну реакцию	
	96-луночный планшет	384-луночный планшет
Мастер-микс для ПЦР	11 мкл	5,5 мкл
Образец, разведенный 1:100 ^[1]	9 мкл	4,5 мкл

^[1] Для стандарта заменить образец контрольной библиотекой для реакции кПЦР, подготовленном на шаге 1. Для отрицательного контроля заменить образец водой без нуклеаз.

8.2.1.5.2.4. В соответствии с таблицей ниже настройте программу в амплификаторе в режиме реального времени.

- Введите концентрации стандартов.
- Выберите референсный краситель ROX как пассивный референсный краситель.
- Установите объем реакции на 20 мкл.
- Выберите краситель FAM/MGB.

Примечание: программа быстрой амплификации была разработана для амплификатора «StepOnePlus» в быстром режиме.

Формат планшета	Режим запуска	Стадия	Температура	Время
48-/96-луночный планшет, быстрый режим ИЛИ 384-луночный планшет	Быстрый	Инкубация с урацил-ДНК-гликозилазой	50 °C	2 минуты
		Активация полимеразы	95 °C	20 секунд
		Циклы (40 циклов)	95 °C	1 секунда
			60 °C	20 секунд
96-луночный планшет, стандартный режим	Стандартный	Инкубация с урацил-ДНК-гликозилазой	50 °C	2 минуты
		Активация полимеразы	95 °C	2 минуты
		Циклы (40 циклов)	95 °C	15 секунд
			60 °C	1 минута

8.2.1.5.2.5. В соответствии с результатами qPCR рассчитайте среднюю концентрацию неразведенных библиотек умножением полученных концентраций на 100.

8.2.1.5.2.6. Основываясь на рассчитанной концентрации библиотек, рассчитайте разведение до концентрации около 50 pM. Например:

- Концентрация неразведенной библиотеки составляет 300 pM.
- Коэффициент разведения составляет $300 \text{ pM} / 50 \text{ pM} = 6$.
- Таким образом, 10 мкл библиотеки необходимо смешать с 50 мкл lowTE (разведение 1:6) для получения концентрации около 50 pM.

8.2.1.5.2.7. Разведите библиотеки до 50 pM как описано, объедините библиотеки (см. п. 8.2.1.7.), затем перейдите к этапу подготовки матрицы (п. 8.4), либо храните библиотеки как описано ниже.

Внимание! Неразведенные библиотеки могут храниться при 4–8 °C в течение 1 месяца. Для более длительного хранения поместите образцы на –20 °C. Рекомендуется перенести образцы в низкоадгезивные пробирки для долговременного хранения.

Дополнительно: Если концентрация библиотеки составляет менее 50 pM, эта проблема может быть решена с помощью амплификации библиотеки. Амплифицируйте библиотеки с помощью *Набора для ПЦР-обогащения библиотек* и проведите их очистку.

8.2.1.5.3. Амплификация библиотек

8.2.1.5.3.1. Смешайте 25 мкл неамплифицированной библиотеки с 72 мкл *Набора для ПЦР-обогащения библиотек* и 3 мкл *Праймеров для амплификации библиотек*.

Примечание: *Набор для ПЦР-обогащения библиотек* и смесь *Праймеров для амплификации библиотек* могут быть объединены перед нанесением.

8.2.1.5.3.2. Поставьте планшет в термоциклер и запустите программу по следующему протоколу:

Фаза	Температура	Время
Удержание	98 °C	2 минуты
5 циклов	98 °C	15 секунд
	64 °C	1 минута
Удержание	10 °C	∞

Внимание! Образцы могут храниться при -20°C . Возможно увеличение количества циклов амплификации (до 10 циклов).

8.2.1.5.4. Очистка амплифицированных библиотек

Проведите два этапа очистки с помощью магнитных частиц «Agencourt AMPure XP Reagent»:

- Первый этап при соотношении объемов магнитных частиц к образцу равному 0,5X: ДНК с высоким молекулярным весом связывается с частицами, в то время как ампликоны и праймеры остаются в растворе. Сохраните супернатант.
- Второй этап при соотношении объемов магнитных частиц к образцу равному 1,2X: ампликоны связываются с частицами, праймеры остаются в растворе. Сохраните осадок и смойте ампликоны с магнитных частиц.

ВАЖНО! Заранее достаньте магнитные частицы «Agencourt AMPure XP Reagent», чтобы они были комнатной температуры. Тщательно провортексируйте частицы перед использованием. Медленно набирайте раствор в наконечник дозатора. Используйте свежеприготовленный 70 % спирт для следующих этапов. Объедините 230 мкл спирта с 100 мкл воды без нуклеаз для каждого образца.

8.2.1.5.4.1. Первый этап очистки

8.2.1.5.4.1.1. Аккуратно постучите планшетом по плоской твердой поверхности, либо соберите капли центрифугированием, удалите пленку с планшета.

8.2.1.5.4.1.2. Добавьте по 25 мкл (0,5X объема образца) магнитных частиц «Agencourt AMPure XP Reagent» к каждой лунке, содержащей около 50 мкл образца. Тщательно перемешайте магнитные частицы с раствором ДНК пятикратным пипетированием.

8.2.1.5.4.1.3. Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 5 минут.

8.2.1.5.4.1.4. Поставьте планшет на магнитный штатив, инкубируйте не менее 5 минут, пока раствор не станет прозрачным.

8.2.1.5.4.1.5. Аккуратно переместите супернатант из каждой лунки в новую лунку 96-луночного планшета для ПЦР не задевая осадок.

ВАЖНО! Супернатант содержит необходимые ампликоны. **Не выбрасывайте супернатант!**

8.2.1.5.4.2. Второй этап очистки

8.2.1.5.4.2.1. К полученному супернатанту добавьте 60 мкл (1,2X исходного объема образца) магнитных частиц «Agencourt AMPure XP Reagent». Тщательно перемешайте магнитные частицы с раствором ДНК пятикратным пипетированием.

8.2.1.5.4.2.2. Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 5 минут.

8.2.1.5.4.2.3. Поставьте планшет на магнитный штатив, инкубируйте не менее 3 минут, пока раствор не станет прозрачным. Аккуратно удалите и выбросьте супернатант, не задевая осадок.

ВАЖНО! Ампликоны связаны с магнитными частицами. **Не выбрасывайте магнитный осадок!**

8.2.1.5.4.2.4. Добавьте 150 мкл свежеприготовленного 70 % спирта в каждую лунку, переместите планшет со сдвигом на 1 ряд туда и обратно, чтобы промыть частицы. Аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок.

Примечание: если у магнитного штатива нет двух позиций для промывки частиц, снимите планшет с магнита и аккуратно пропипетируйте 5 раз объемом 100 мкл, затем поместите планшет обратно на магнитный штатив и инкубируйте 2 минуты, пока раствор не станет прозрачным.

8.2.1.5.4.2.5. Повторите этап 8.2.1.5.4.2.4. для повторной отмывки.

8.2.1.5.4.2.6. Убедитесь, что все капли спирта удалены. Оставляя открытый планшет на магнитном штативе, высушите магнитный осадок при комнатной температуре в течение 2-5 минут. Не пересушивайте осадок.

8.2.1.5.4.2.7. Снимите планшет с очищенными библиотеками с магнитного штатива, добавьте 50 мкл буфера lowTE к осадку, чтобы растворить его.

8.2.1.5.4.2.8. Запечатайте планшет пленкой, тщательно перемешайте вортиксированием и коротко отцентрифугируйте, чтобы собрать капли. Также можно перемешать образец пятикратным пипетированием половинного объема.

8.2.1.5.4.2.9. Инкубируйте образцы при комнатной температуре не менее 2 минут.

8.2.1.5.4.2.10. Поставьте планшет на магнитный штатив не менее, чем на 2 минуты, затем проанализируйте аликвоту супернатанта как описано в пункте 8.2.1.5.2. Измерение концентрации библиотеки методом qPCR и вычисление коэффициента разведения.

ВАЖНО! Супернатант содержит необходимые ампликоны. **Не выбрасывайте супернатант!**

Измеряйте концентрацию библиотек с помощью *Набора для измерения концентрации библиотек* (см п. 8.2.1.5.2. Измерение концентрации библиотеки методом qPCR и вычисление коэффициента разведения.)

Как правило, концентрация амплифицированных библиотек составляет 2 000 – 10 000 pM. Концентрация библиотек не является абсолютным критерием качества. После измерения концентрации определите коэффициент разведения для получения библиотек с концентрацией около 50 pM.

8.2.1.5.4.2.11. Разведите библиотеку до концентрации около 50 pM, объедините библиотеки, затем перейдите к этапу подготовки матрицы (п.8.4.), либо храните библиотеки как описано ниже.

8.2.1.6. Хранение библиотек

Библиотеки могут храниться при температуре 4–8 °C до 1 месяца. Для более длительного хранения поместите образцы на –20 °C.

Примечание: рекомендуется перенести супернатант в низкоадгезивные пробирки для длительного хранения.

8.2.1.7. Объединение библиотек ДНК и РНК

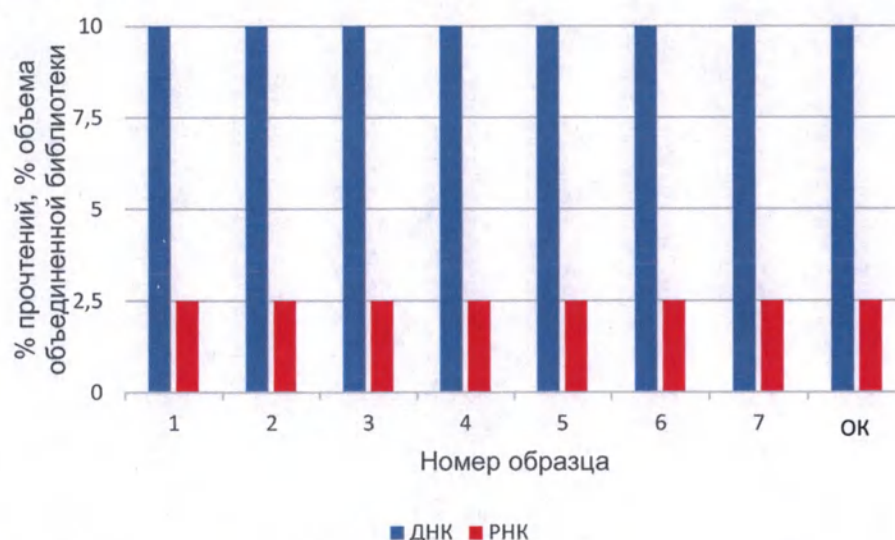
Объедините библиотеки ДНК и РНК, чтобы получить различное количество прочтений.

Если сравнивать библиотеки, полученные из ДНК и РНК, предпочтительное количество прочтений для ДНК составляет один миллион прочтений, а для РНК достаточно только 250 000 прочтений из того же образца ткани. Чтобы

получить ожидаемую пропорцию количества прочтений, можно объединить неравные объемы библиотек ДНК и РНК, приготовленных из одного образца. В зависимости от емкости чипа, варьируется количество пар образцов ДНК/РНК, размещенных на одном чипе. В качестве примера представлена таблица ниже.

Типичный прогон секвенирования дает $\sim 3,5 \times 10^6$ прочтений.

При пулировании библиотек ДНК и РНК разных образцов с уникальными баркодами, каждую библиотеку необходимо разбавить до концентрации 50 pM, а затем объединить в соотношении 80:20 (ДНК: РНК). Концентрация библиотек для отрицательного контроля часто меньше 50 pM. Для прогонов, включающих библиотеку отрицательного контроля с концентрацией <50 pM, добавьте тот же объем пулированной библиотеки отрицательного контроля как для образца с концентрацией 50 pM.



Образец	Баркод	Удельный объем/ доля прочтений
DNA-1	баркод 1	0,1
RNA-1	баркод 2	0,025
DNA-2	баркод 3	0,1
RNA-2	баркод 4	0,025
DNA-3	баркод 5	0,1
RNA-3	баркод 6	0,025
DNA-4	баркод 7	0,1
RNA-4	баркод 8	0,025
DNA-5	баркод 9	0,1
RNA-5	баркод 10	0,025
DNA-6	баркод 11	0,1
....		

Мы рекомендуем секвенировать до 7 образцов плюс 1 отрицательный контроль для ДНК и 1 отрицательный контроль для РНК на одном чипе, каждый образец состоит из одной библиотеки ДНК и одной библиотеки РНК, которые объединены в соотношении 80:20 (8 мкл библиотеки ДНК + 2 мкл библиотеки РНК).

РНК). Если вам нужно объединить библиотеки по-другому, вы можете определить среднее количество прочтений на ампликон, выполнив простой расчет. Примеры расчетов приведены ниже.

Примеры расчетов

Пример 1:

У вас есть 7 образцов, каждый из которых состоит из одной библиотеки ДНК и одной библиотеки РНК. Мы рекомендуем стандартный метод объединения библиотек в соотношении 80:20 (ДНК: РНК). Затем вы можете рассчитать среднее количество прочтений на ампликон, как показано в следующей таблице:

ДНК	РНК
1. $3,5 \times 10^6$ прочтений/7 образцов = 500,000 прочтений на пул библиотек 2. $0,8^{[1]} \times 500,000 = 400,000$ прочтений на библиотеку ДНК 3. Среднее количество прочтений на ампликон: 400,000 прочтений на библиотеку ДНК/269 ампликонов ^[2] = 1487	1. $3,5 \times 10^6$ прочтений /7 образцов = 500,000 прочтений на пул библиотек 2. $0,2^{[3]} \times 500,000 = 100,000$ прочтений на библиотеку РНК 3. Среднее количество прочтений на ампликон: 100,000 прочтений на библиотеку РНК/13 ампликонов ^[4] = 7,692 Примечание. При обнаружении химерного транскрипта общее количество ампликонов составит 13 + N (N = количество обнаруженных химерных транскриптов).

[1] Доля ДНК-части в объединенной библиотеке.

[2] Количество ампликонов в наборе.

[3] Доля РНК-части в объединенной библиотеке.

[4] Количество ампликонов для контроля экспрессии генов в наборе.

Пример 2:

У вас есть 6 образцов, включая положительный и отрицательный контроль (ОК), каждый из которых состоит из одной библиотеки ДНК и одной библиотеки РНК. Мы рекомендуем стандартный метод объединения библиотек в соотношении 80:20 (объем ДНК: РНК). Затем вы можете рассчитать среднее количество прочтений на ампликон, как показано в следующей таблице:

В этом примере предполагается незначительное количество прочтений для библиотек образца ОК.

ДНК	РНК
1. $3,5 \times 10^6$ прочтений/5 образцов ^[1] = 700,000 прочтений на объединенную библиотеку 2. $0,8^{[2]} \times 700,000 = 560,000$ прочтений на библиотеку ДНК 3. Среднее количество прочтений на ампликон: 560,000 прочтений на библиотеку ДНК/269 ампликонов ^[3] = 2082	1. $3,5 \times 10^6$ прочтений /5 образцов = 700,000 прочтений объединенную библиотеку 2. $0,2^{[4]} \times 700,000 = 140,000$ прочтений на библиотеку РНК 3. Среднее количество прочтений на ампликон: 140,000 прочтений на библиотеку РНК/13 ампликонов ^[5] = 10,769 Примечание. При обнаружении Химерных транскриптов общее количество ампликонов составит 13 + N (N = количество обнаруженных Химерных транскриптов).

[1] 4 образца + 1 положительный контроль

[2] Доля смешанной библиотеки, приготовленной из ДНК-части.

[3] Количество ампликонов в наборе.

[4] Доля смешанной библиотеки, состоящей из РНК.

[5] Количество ампликонов для контроля экспрессии генов в наборе.

Пример 3:

У вас есть 4 образца, каждый из которых состоит из одной библиотеки ДНК и одной библиотеки РНК, и еще 4 библиотеки РНК, которые вы хотите повторно секвенировать. Мы рекомендуем объединить все библиотеки ДНК между собой и все библиотеки РНК между собой и затем объединить их в соотношении 80:20 (ДНК: РНК). Затем вы можете рассчитать среднее количество прочтений на ампликон, как показано в следующей таблице.

ДНК	РНК
1. $3,5 \times 10^6$ прочтений $\times 0,8 = 2,8 \times 10^6$ прочтений на все ДНК библиотеки 2. 8×10^6 прочтений / 4 ДНК библиотеки = 700,000 прочтений на библиотеку ДНК 3. Среднее количество прочтений: 700,000 прочтений на библиотеку ДНК / 269 ампликонов = 2602	1. $3,5 \times 10^6$ прочтений $\times 0,2 = 700,000$ прочтений на все РНК библиотеки 2. 700,000 прочтений / 8 библиотек РНК = 87,500 прочтений на библиотеку РНК 3. Среднее количество прочтений: 87,500 прочтений на библиотеку РНК / 13 ампликонов = 6,731 Примечание. При обнаружении Химерных транскриптов общее количество ампликонов составит $13 + N$ (N = количество обнаруженных Химерных транскриптов).
<i>Чтобы объединить библиотеки ДНК и РНК для получения одинаковых средних значений прочтений на ампликон, вам нужно будет объединить их в другом соотношении:</i> <i>Примечание: этот метод может быть предпочтительным, потому что он дает одинаковое или большее количество прочтений для каждой библиотеки ДНК и РНК, сохраняя чувствительность анализа.</i>	
Определить долю ДНК-ампликонов (D_d) (D_d = количество ампликонов ДНК / общее количество ампликонов) $D_d = (269 \times 4) / ((269 \times 4) + (13 \times 8)) = 0,91$ $3,5 \times 10^6$ прочтений $\times D_d = 3,185 \times 10^6$ прочтений для 4 библиотек ДНК $3,185 \times 10^6$ прочтений / (4 библиотеки $\times$ 269 ампликонов) = 2960 среднее количество прочтений на ампликон	Определить долю РНК-ампликонов (D_r) (D_r = количество ампликонов РНК / общее количество ампликонов) $D_r = (13 \times 8) / ((269 \times 4) + (13 \times 8)) = 0,09$ $3,5 \times 10^6$ прочтений $\times D_r = 3,15 \times 10^5$ прочтений для 8 библиотек РНК $3,15 \times 10^5$ прочтений / (8 библиотек $\times$ 13 ампликонов) = 3,029 среднее количество прочтений на ампликон

Пример 4:

У вас есть только образцы РНК, и вы хотите определить, сколько библиотек можно объединить за один запуск секвенирования с хорошим средним количеством прочтений на ампликон.

РНК
$3,5 \times 10^6$ прочтений / 100 000 прочтений на библиотеку РНК (рассчитано в примере 1) = 35 библиотек РНК. Примечание. Ограничивающим фактором при объединении библиотек является количество баркодов

Пример 5:

У вас есть только образцы ДНК, и вы хотите определить, сколько библиотек можно объединить за один запуск секвенирования с хорошим средним количеством прочтений на ампликон.

ДНК
$3,5 \times 10^6$ прочтений / 400 000 прочтений на библиотеку ДНК (рассчитано в примере 1) = 8,75 библиотек ДНК. Примечание. Мы рекомендуем объединять не более 7 библиотек ДНК для каждого запуска секвенирования.

8.2.2. Автоматическое создание библиотек с помощью станции пробоподготовки (для набора «ОнкоФокус 32 авто»)

Необходимые материалы

- Набор реагентов для обратной транскрипции (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Набор «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Набор для измерения концентрации библиотек (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
- Реагент для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agencourt AMPure XP»)
- Термоциклер
- Планшеты, пленки, магнитный штатив
- Автоматический дозатор переменного объема на 2-200 мкл с наконечниками с фильтром
- Вода без нуклеаз
- Этанол, 70%

8.2.2.1. Оценка концентрации выделенной РНК

Общие методические указания для выделения и оценки концентрации РНК

- Для оценки концентрации выделенной РНК рекомендуется использовать спектрофотометр «NanoDrop 2000».
- Для каждой реакции обратной транскрипции требуется 10 нг ($\geq 1,43$ нг/мкл) тотальной РНК, обработанной ДНКазой.
- Как правило, концентрация библиотек из РНК высокого качества получается выше, чем из деградировавших образцов. Концентрация библиотеки не отражает качество последующего секвенирования.
- Увеличение количества РНК обычно приводит к получению библиотек более высокого качества, особенно в тех случаях, когда качество или количество РНК неизвестны. Допускается использовать 1 нг тотальной РНК только для образцов хорошего качества с достоверно измеренной концентрацией.

Перед началом измерения выберите «RNA-40» и единицы измерения «ng/ul». Добавьте 1 мкл воды без нуклеаз на специальную подложку прибора для разовой калибровки (установления нулевого значения). Опустите плечо прибора и нажмите кнопку «Blank». После этого протрите каплю чистой сухой, безворсовой лабораторной салфеткой. Проведите эту процедуру еще один раз. Осторожно провортексируйте/перемешайте пипеткой пробирку с выделенной РНК. Затем нанесите 1 мкл выделенной РНК образца на специальную подложку прибора, закройте плечо прибора и нажмите «Measure». Протрите измерительную

подложку и подвижное плечо с помощью сухой, безворсовой лабораторной салфетки, и измерьте следующий образец.

С помощью программного обеспечения к прибору после измерения выдается график измерения и концентрация, основанная на поглощении при длине волны 260 нм. Также программное обеспечение прибора выдает значение 260/280, которое является коэффициентом поглощения при 260 нм и 280 нм. Для РНК пороговое значение коэффициента обычно 2.0.

Зафиксируйте получившиеся результаты.

8.2.2.2. Оценка концентрации выделенной ДНК

**Общие
методические
указания для
выделения и оценки
концентрации ДНК**

- Для оценки концентрации выделенной ДНК рекомендуется использовать спектрофотометр «NanoDrop 2000».
- Для каждой реакции таргетной амплификации используйте 300-30,000 копий ДНК (10 нг ДНК, $\geq 0,83$ нг/мкл).
- Увеличение количества ДНК позволяет получить библиотеки более высокого качества, особенно в тех случаях, когда качество или количество ДНК неизвестны. Рекомендуется использовать 1 нг ДНК (300 копий) только для образцов хорошего качества с достоверно измеренной концентрацией.

Перед началом измерения выберите «DNA-50» и единицы измерения «ng/ul». Добавьте 1 мкл воды без нуклеаз на специальную подложку прибора для разовой калибровки (установления нулевого значения). Опустите плечо прибора и нажмите кнопку «Blank». После этого протрите каплю чистой сухой, безворсовой лабораторной салфеткой. Проведите эту процедуру еще один раз. Осторожно провортексируйте/перемешайте пипеткой пробирку с выделенной ДНК. Затем нанесите 1 мкл выделенной ДНК образца на специальную подложку прибора, закройте плечо прибора и нажмите «Measure». Протрите измерительную подложку и подвижное плечо с помощью сухой, безворсовой лабораторной салфетки, и измерьте следующий образец.

С помощью программного обеспечения к прибору после измерения выдается график измерения и концентрация, основанная на поглощении при длине волны 260 нм. Также программное обеспечение прибора выдает значение 260/280, которое является коэффициентом поглощения при 260 нм и 280 нм. Для ДНК пороговое значение коэффициента обычно 1.8.

Зафиксируйте получившиеся результаты.

8.2.2.3. Обратная транскрипция РНК с помощью *Набора реагентов для обратной транскрипции*

Если вы начинаете подготовку библиотек с РНК, в первую очередь необходимо перевести РНК в cДНК в результате реакции обратной транскрипции.

8.2.2.3.1. Согреейте реакционную *Мастер-микс для обратной транскрипции*, 5X при комнатной температуре в течение не менее, чем 20 минут, затем провортексируйте. Если в пробирке виден осадок, продолжайте мешать на

вортексе, пока реакционная смесь *Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X* не будет полностью ресуспендирована.

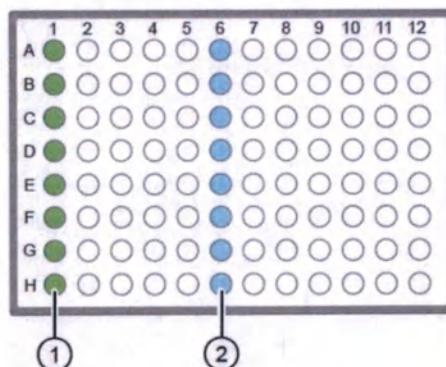
8.2.2.3.2. Прогрейте образец РНК при 80 °С в течение 10 минут, затем остудите до комнатной температуры.

8.2.2.3.3. Снимите пленку с *Планшета «ОФ-авто»*, содержащего набор баркодов (входит в *Набор реагентов «ОФ-авто»* для создания библиотек).

8.2.2.3.4. Для каждого образца в отдельные лунки в столбце 1 на *Планшете* добавьте следующие компоненты. При работе с несколькими образцами подготовьте мастер-микс без РНК.

Компонент	Объем на одну реакцию
<i>Мастер-микс для обратной транскрипции, 5X</i>	3 мкл
<i>Фермент для обратной транскрипции, 10X</i>	1,5 мкл
Тотальная РНК (10 нг) ^[1]	≤ 10,5 мкл
Вода без нуклеаз	до 15 мкл
Общий объем	15 мкл

^[1] Для приготовления отрицательного контроля используйте соответствующий объем воды без нуклеаз или буфера LowTE.



① Каждая лунка столбца 1 содержит 15 мкл смеси для реакции обратной транскрипции, либо отрицательный контроль к реакции транскрипции.

② Каждая лунка столбца 6 содержит лиофилизированные баркоды. Баркод с наименьшим номером находится в лунке А6, с наибольшим – в Н6.

8.2.2.3.5. Запечатайте планшет пленкой, тщательно провортексируйте, затем сбросьте капли центрифугированием. На планшете все лунки с баркодами светло-голубые.

ВАЖНО! Поместите пленку левее, чтобы она не закрывала этикетку со штрихкодом. Если этикетка со штрихкодом повреждена, вы сможете пропустить эту ошибку на этапе сканирования платформы станции пробоподготовки.

8.2.2.3.6. Поставьте планшет в термоциклер и запустите программу синтеза кДНК по следующему протоколу:

Температура	Время
42 °C	30 минут
85 °C	5 минут
10 °C	∞

Внимание! Образцы могут храниться при 10 °C в не более 16 часов в термоциклере. Для более длительного хранения поместите образцы на –20 °C.

8.2.2.3.7. Сбросьте капли центрифугированием.

8.2.2.4. Оттаивание реагентов и подготовка станции пробоподготовки

- Перед запуском оставьте один *Картридж ОФ-авто* с реагентами для станции пробоподготовки для оттаивания на 20 минут.
- Достаньте *Панели «ОФ-авто»* для оттаивания.
- Проведите процедуры разгрузки и очистки станции пробоподготовки, если они не были проведены после предыдущего запуска.
- Убедитесь, что станция пробоподготовки имеет соединение сервером секвенатора «Torrent Server». На экране станции пробоподготовки коснитесь **Settigs** ▶ **Torrent Sever** чтобы увидеть статус соединения станции.

(Дополнительно) Создание «Серии образцов»

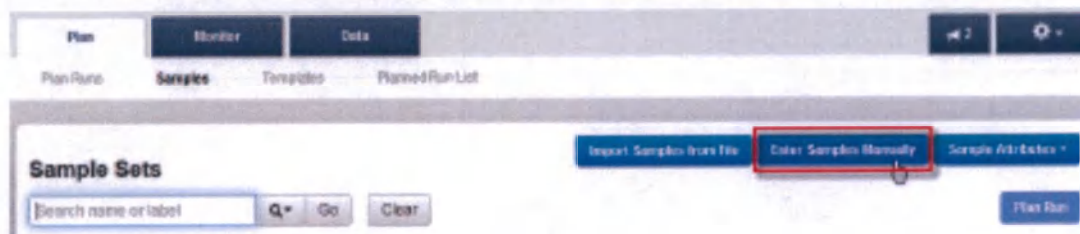
Дополнительное отслеживание образцов с помощью Torrent Server позволяет проследить образцы, сгруппированные в «Серию образцов» начиная с подготовки библиотек и матрицы до загрузки чипа, секвенирования и анализа данных.

Замечание: Автоматическое отслеживание образцов начиная с подготовки библиотек до секвенирования поддерживается только для библиотек, подготовленных в рамках одной «Серии образцов» одним набором AmpliSeq и в одном запуске станции пробоподготовки. Если библиотеки, подготовленные из разных AmpliSeq для запусков станции пробоподготовки, объединены в пробирке для образцов библиотек при запуске подготовки матрицы на станции пробоподготовки, необходимо ввести номера образцов вручную при создании Запланированного запуска.

Для создания «Серии образцов»

8.2.2.4.1. Войдите на сервер «Torrent Server» через браузер.

8.2.2.4.2. Во вкладке «Plan» (**Запланировать**) выберите «Samples» (Образцы), затем нажмите **Enter Samples Manually** (**Введите образцы вручную**).



8.2.2.4.3. Нажмите **Enter New Sample** (**Введите новый образец**).

8.2.2.4.4. В окне «Add Sample» (**Добавить образец**):

а. Введите Sample Name (**Название образца**).

б. Выберите позицию образца на **PCR Plate Position (A-H)** (Позиция образца на планшете для ПЦР (A-H)).

в. Выберите соответствующие значения в **Barcode Kits (Наборы баркодов)** (**Ion Code Barcodes 1-32**) и поля баркодов.

г. Введите дополнительную информацию в разделы правой стороны окна и нажмите **Done (Сделать)**.

8.2.2.4.5. Повторите шаги 3 и 4 для каждого образца в вашей «Серии образцов» (до 8).

8.2.2.4.6. Нажмите **Save Sample Set (Сохранить Серию образцов)**, затем в окне **Save Samples (Сохранение образцов)** нажмите **Add Sample Set (Добавить Серию Образцов)**.

8.2.2.4.7. В окне **Save Samples** введите информацию или выберите из списка:

Название «Серии образцов»

Тип группы

Набор для создания библиотек

Серийный номер Планшета для ПЦР (дополнительно)

Описание (дополнительно).

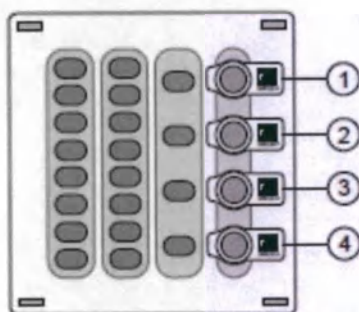
Замечание: Присвойте каждой Серии образцов уникальное имя чтобы избежать ошибок при выборе Серии образцов при создании Запланированного запуска.

Нажмите **Save (Сохранить)**.

8.2.2.5. Установка пробирок с панелями в станцию пробоподготовки

Добавление Панелей «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X в позиции А и В картриджа с реагентами:

8.2.2.5.1. Откройте все 4 пробирки в позициях А, В, С и D в Картридже «ОФ-авто» с реагентами для станции пробоподготовки.



(1) Позиция А (Панель «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X)

(2) Позиция В (Панель «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X)

(3) Позиция С (Пустая пробирка)

(4) Позиция D (Конечная пробирка)

8.2.2.5.2. Вставьте 2 пробирки с Панелями «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X в Картридж ОФ-авто с реагентами для станции пробоподготовки:

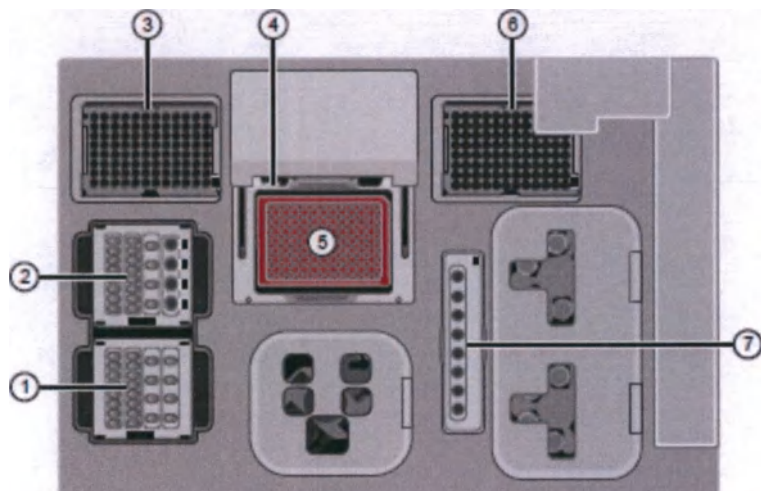
а) Провортексируйте пробирки с Панелью «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X, а затем отцентрифугируйте.

б) Снимите крышки, затем замените пробирки в позиции А и В Картриджа ОФ-авто с реагентами для станции пробоподготовки на пробирки с Панелями «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек.

Замечание: По окончании запуска конечная пробирка в Позиции D содержит 700 мкл объединенных баркодированных библиотек.

8.2.2.6. Загрузка станции пробоподготовки

Выполните нижеописанные процедуры для того, чтобы загрузить станцию пробоподготовки. Полностью загруженная станция показана на рисунке ниже:

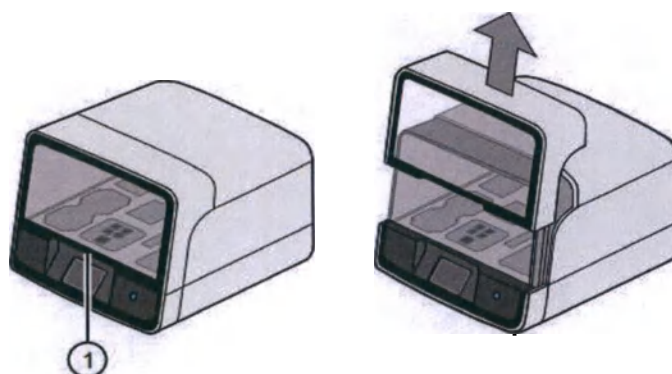


- (1) Картридж «ОФ-авто» с растворами для станции пробоподготовки
- (2) Картридж «ОФ-авто» с реагентами для станции пробоподготовки
- (3) Наконечники одноразовые «ОФ-авто»
- (4) Профольгированная крышка
- (5) Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов
- (6) Штатив для пустых наконечников
- (7) Штатив с пробирками для модуля обогащения

ВНИМАНИЕ! При установке картриджей не применяйте чрезмерное усилие. Для каждого картриджа предусмотрено только одно место и положение на платформе. Если картридж не подходит, убедитесь в том, что вы устанавливаете соответствующие картриджи в правильном положении.

8.2.2.6.1. Откройте дверцу станции пробоподготовки

- а. Нажмите кнопку  (Открыть дверцу) на сенсорном экране изделия для того, чтобы отрыть дверцу. Затем подождите, пока защелка не откроется.
- б. Поднимайте дверцу прибора вверх до тех пор, пока не сработает механизм блокировки.



- (1) Нажмите здесь, затем поднимите.

8.2.2.6.2. Загрузите Картридж ОФ-авто с растворами для станции пробоподготовки в станцию пробоподготовки:

- а. Аккуратно постучите по картриджу с растворами на столе для того, чтобы растворы собрались на дне пробирок.
- б. Загрузите картридж в станцию таким образом, чтобы он прочно зафиксировался в необходимом положении и располагался ровно на платформе.

8.2.2.6.3. Загрузите Картридж ОФ-авто с растворами для станции пробоподготовки в станцию пробоподготовки:

Версия 25.02.2022

- а. Аккуратно постучите по картриджу с реагентами на столе для того, чтобы реагенты собрались на дне пробирок.
- б. Загрузите картридж в станцию таким образом, чтобы он прочно зафиксировался в необходимом положении и располагался ровно на платформе.

ВНИМАНИЕ! Убедитесь, что 4 пробирки с баркодами на картридже с реагентами открыты и загружены в Позиции А-D и Панель «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X добавлены в позиции А и В.

8.2.2.6.4. Установите пустой штатив из-под наконечников от предыдущего запуска в положение «Использованные наконечники». Затем смените перчатки.

8.2.2.6.5. Установите новый штатив с наконечниками «ОФ-авто».

а. Распакуйте новый штатив с наконечниками и снимите крышку для того, чтобы открыть наконечники.

б. Переместите защелку вперед для того, чтобы поднять зажимную скобу. Разместите штатив с наконечниками в положение «Новые наконечники». Опустите скобу, затем переведите защелку в заднее положение для того, чтобы зафиксировать штатив в определенном положении.

Примечание: Запуск не пройдет успешно, если вы не закроете скобу.

8.2.2.6.6. Если вы готовите библиотеки из РНК, аккуратно снимите профольгированную крышку с планшета, содержащей кДНК.

ВНИМАНИЕ! Начинайте с левой стороны планшета, чтобы снизить шанс разрушения баркода с правой стороны планшета.

Чтобы предотвратить разбрызгивание реакции обратной транскрипции во время удаления профольгированной крышки, мы рекомендуем установить планшет в штатив, затем осторожно снимите крышку одной рукой одновременно крепко придерживая планшет на штативе другой рукой. Проверьте колонку с лунками № 1 нет ли капель со стороны лунок. Наденьте новую крышку и отцентрифугируйте заново и собрать капли на дне лунок, если необходимо.

8.2.2.6.7. Установите планшет, содержащий кДНК, в блок термоциклера станции пробоподготовки так чтобы позиция А1 была в верхнем левом углу, затем прижмите чтобы установить на место.

8.2.2.6.8. Затем вставьте новую профольгированную крышку под автоматическую нагреваемую крышку.

ВНИМАНИЕ! Когда профольгированная крышка установлена правильно, ее упоры направлены вверх и контактируют с нагреваемой крышкой.

8.2.2.6.9. Установите штатив с пробирками для модуля обогащения. Затем прижмите штатив для того, чтобы он был на одном уровне с платформой.

8.2.2.6.10. Закройте дверцу станции пробоподготовки, опуская дверцу, пока замок не заблокируется. После закрытия дверцы активируется система изображения.

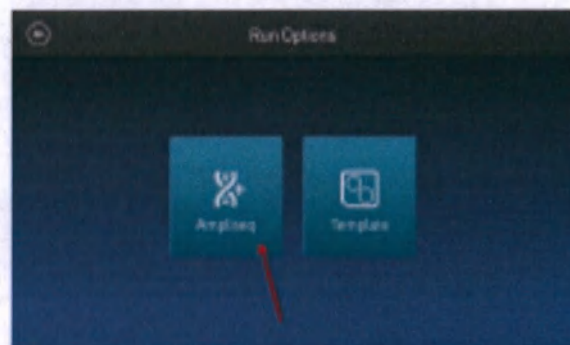
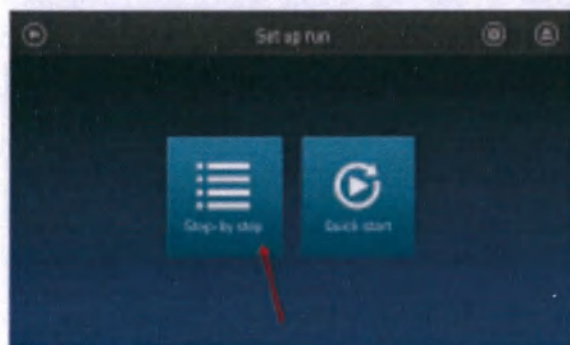
ВНИМАНИЕ! Не закрывайте дверцу, просто опустив ее вниз. Вы должны слегка поднять дверцу, прежде чем закрыть ее. Убедитесь в том, что обе стороны дверцы заблокированы после закрытия.

8.2.2.7. Запуск станции пробоподготовки

8.2.2.7.1. В главном окне станции нажмите кнопку «Set up run» (Настройка запуска).



8.2.2.7.2. Нажмите кнопку «Step by Step» (Поэтапно) для того, чтобы поэтапно настроить станцию или нажмите кнопку «AmpliSeq» на экране «Run options» (Варианты запуска).



8.2.2.7.3. Убедитесь, что вы полностью загрузили станцию пробоподготовки, проведя проверку платформы, выполняя шаги, указанные на экране.

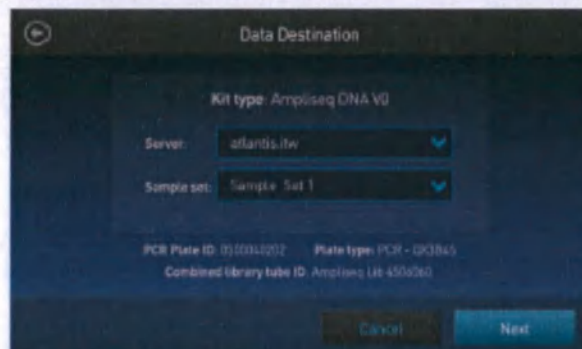
8.2.2.7.4. Нажмите **Start check** (Начните проверку) на экране **Close Door** (Закрывать дверь).



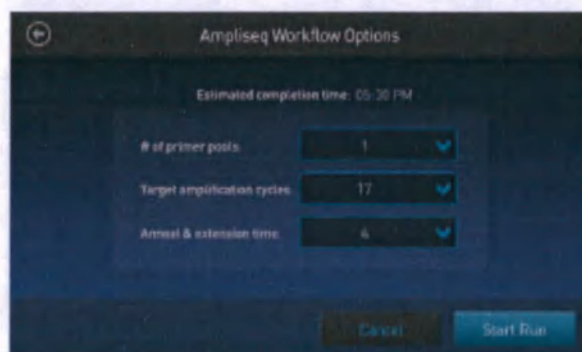
Замечание: Если планшет не опознан, выберите соответствующий планшет. Если не выбрана или не запланирована «Серия образцов», появится сообщение: Не найдена Серия образцов. Продолжить? Нажмите **ОК**.

8.2.2.7.5. После окончания проверки платформы (около 3 минут) нажмите **Next (Далее)**.

8.2.2.7.6. На экране **«Data Destination» (Данные для передачи)** подтвердите информацию о сервере и серии образцов, затем нажмите **Next (Далее)**.



8.2.2.7.7. Введите нужное количество *Панелей* (1 панель), количество циклов таргетной амплификации (21 цикл для ДНК и 28 циклов для РНК (кДНК)), время отжига/элонгации (4 мин).



Во время настройки станции пробоподготовки введите следующие параметры при появлении запроса.

Для образцов ДНК необходимо от 18 до 21 цикла таргетной амплификации, для образцов РНК – от 28 до 31 цикла таргетной амплификации. Для образцов низкого качества может потребоваться использование количества циклов из верхней границы диапазона.

Исходный материал	Количество пулов праймеров	Количество циклов таргетной амплификации	Время отжига и элонгации
ДНК ^[1]	1	18	4 минуты
FFPE ДНК ^[1]	1	21	4 минуты
РНК (кДНК) ^[1]	1	28	4 минуты
FFPE РНК ^[1]	1	31	4 минуты

^[1] Если в одном запуске присутствуют образцы как высокого, так и низкого качества, используйте параметры для образцов низкого качества.

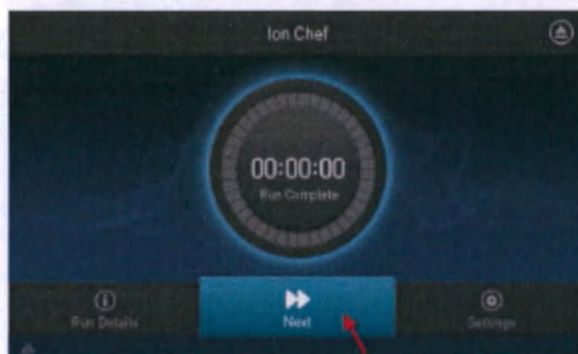
Примечание: праймеры в наборе предоставляются в концентрации 2X и не требуют разведения перед внесением в станцию пробоподготовки.

Рекомендованное в таблице число циклов амплификации приведено для количества ДНК/РНК 10 нг. Скорректируйте число циклов для другого содержания ДНК/РНК.

Начальное количество ДНК/РНК	Скорректированное количество циклов
1 нг (300 копий)	+3
10 нг (3000 копий)	0
100 нг (30,000 копий)	-3

8.2.2.7.8. Нажмите **Start Run (Начать запуск)**.

8.2.2.7.9. Примерно через 7 часов, вернитесь к станции пробоподготовки. На экране **Run Complete (Запуск закончен)** нажмите **Next (Далее)** для выполнения стадий разгрузки и очистки.



ВНИМАНИЕ! После запуска баркодированные библиотеки находятся в пробирке в Позиции D картриджа реагентов. Чтобы не потерять жидкость из-за испарения, выньте и закройте пробирку крышкой как можно быстрее после окончания запуска. Не оставляйте пробирку в станции более чем 24 часа после начала запуска. После 24 часов после старта запуска охлаждающий блок станции перестает охлаждать и образец нагревается до 27°C.

Замечание: Нажмите **Run Details (Детали запуска)** чтобы ознакомиться с информацией.



8.2.2.7.10. Откройте дверцу станции пробоподготовки:

а. На сенсорном экране станции коснитесь **Open Door (Открыть дверцу)**, затем дождитесь открытия защелки.

б. Поднимите дверцу станции до верха хода, пока механизм защелки входит в зацепление.

Снимите пробирку, содержащую объединенную библиотеку (приблизительная концентрация 100 пМ) из положения D картриджа с реагентами и удалите использованные расходные материалы со станции пробоподготовки и проведите очистку станции в соответствии с п. 8.6.3.

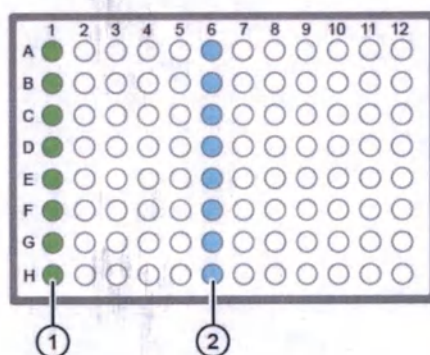
8.2.2.8. Добавление образцов ДНК в Планшет «ОФ-авто», содержащий набор баркодов

8.2.2.8.1. Снимите пленку с Планшета «ОФ-авто», содержащего набор баркодов (входит в Набор реагентов «ОФ-авто» для создания библиотек).

8.2.2.8.2. Для каждого образца в отдельные лунки в столбце 1 на Планшете добавьте следующие компоненты.

Компонент	Объем на одну реакцию
Тотальная ДНК (10 нг, $\geq 0,83$ нг/мкл) ^[1]	≤ 15 мкл
Вода без нуклеаз	до 15 мкл
Общий объем	15 мкл

^[1] Для приготовления отрицательного контроля используйте соответствующий объем воды без нуклеаз или буфера LowTE.



① Каждая лунка столбца 1 содержит 15 мкл разведенной геномной ДНК (0,67 нг/мкл, 10 нг), либо воды без нуклеаз в качестве отрицательного контроля.

② Каждая лунка столбца 6 содержит лиофилизированные баркоды. Баркод с наименьшим номером находится в лунке А6, с наибольшим – в Н6.

Примечание:

- Если вы работаете менее, чем с 8 образцами, рекомендуется добавить повторы имеющихся образцов либо положительные контроли в запуск. Либо необходимо внести по 15 мкл воды без нуклеаз в качестве отрицательного контроля во все лунки столбца 1, которые не содержат образца ДНК.
- Если в постановке 5 образцов и менее, рекомендуется оценить концентрацию полученной объединенной библиотеки с помощью qPCR, чтобы убедиться, что в реакции подготовки матрицы используется оптимальная концентрация.

8.2.2.8.3. Тщательно проверьте каждую лунку на наличие пузырей. Удалите пузыри аккуратным пипетированием. Либо запечатайте планшет пленкой и непродолжительно отцентрифугируйте её.

ВАЖНО! Поместите пленку левее, чтобы она не закрывала этикетку со штрихкодом. Если этикетка со штрихкодом повреждена, вы сможете пропустить эту ошибку на этапе сканирования платформы станции пробоподготовки.

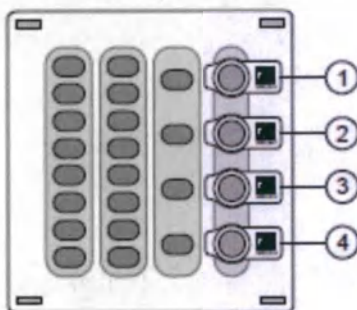
8.2.2.9. Оттаивание реагентов и подготовка станции пробоподготовки

- Перед запуском оставьте один *Картридж ОФ-авто* с реагентами для станции пробоподготовки для оттаивания на 20 минут.
- Достаньте *Панели «ОФ-авто»* для оттаивания.
- Проведите процедуры разгрузки и очистки станции пробоподготовки, если они не были проведены после предыдущего запуска.
- Убедитесь, что станция пробоподготовки имеет соединение сервером секвенатора «Torrent Server». На экране станции пробоподготовки коснитесь **Settigs** ▶ **Torrent Sever** чтобы увидеть статус соединения станции.

8.2.2.10. Установка пробирок с панелями в станцию пробоподготовки

Добавление *Панель «ОФ-авто»* для создания ДНК-библиотек, 2X в позиции А и В картриджа с реагентами:

8.2.2.10.1. Откройте все 4 пробирки в позициях А, В, С и D в *Картридже «ОФ-авто»* с реагентами для станции пробоподготовки.



- (1) Позиция А (*Панель «ОФ-авто»* для создания ДНК-библиотек, 2X)
- (2) Позиция В (*Панель «ОФ-авто»* для создания ДНК-библиотек, 2X)
- (3) Позиция С (Пустая пробирка)
- (4) Позиция D (Конечная пробирка)

8.2.2.10.2. Добавьте 2 пробирки с *Панелями «ОФ-авто»* для создания ДНК-библиотек, 2X в *Картридж ОФ-авто* с реагентами для станции пробоподготовки:

а) Вortexируйте пробирки с *Панель «ОФ-авто»* для создания ДНК-библиотек, 2X для перемешивания, затем центрифугируйте.

б) Снимите крышки, затем замените пробирки в позиции А и В *Картриджа «ОФ-авто»* с реагентами для станции пробоподготовки на пробирки с *Панелями «ОФ-авто»* для создания ДНК-библиотек.

Замечание: По окончании запуска конечная пробирка в Позиции D содержит 700 мкл объединенных баркодированных библиотек.

8.2.2.11. Загрузка и запуск станции пробоподготовки

Проведите загрузку и запуск станции пробоподготовки по аналогии с п. 8.2.2.6–8.2.2.7.

8.2.2.11.1. Откройте дверцу станции пробоподготовки:

а. На сенсорном экране станции коснитесь **Open Door** (Открыть дверцу), затем дождитесь открытия защелки.

б. Поднимите дверцу станции до верха хода, пока механизм защелки входит в зацепление.

Снимите пробирку, содержащую объединенную библиотеку (приблизительная концентрация 100 пМ) из положения D картриджа с реагентами и удалите использованные расходные материалы со станции пробоподготовки и проведите очистку станции в соответствии с п. 8.6.3.

8.3. Создание Запланированного запуска секвенатора

8.3.1. Создать пользовательский шаблон Запланированного запуска

Ниже представлены инструкции для создания шаблона запланированного запуска, в котором ДНК и РНК получены из одного и того же образца.

ВНИМАНИЕ! Для каждого из 2х чипов необходимо запланировать отдельный запуск.

8.3.1.1. Войдите в программное обеспечение системы «F-Genetics» Torrent Suite.

8.3.1.2. На вкладке **Plan** (План) нажмите **Templates** (Шаблоны), затем нажмите **DNA and Fusions** (ДНК и Химерные транскрипты) в левом меню навигации.

8.3.1.3. В списке **DNA and Fusions** найдите шаблон **Oncomine Focus DNA и Fusions for S5 Planned Run**, чтобы создать свой пользовательский план запуска, нажмите **Actions** (Действия) ► **Copy** (Скопировать).

8.3.1.4. В каждом поле на вкладке **Save** (Сохранить) введите или выберите необходимую информацию:

Поле	Действие
Template Name (Название шаблона)	Введите название шаблона запланированного запуска
Set as Favorite (Установить как избранное)	Установите флажок Set as Favorite (Установить как избранное), чтобы добавить собственный шаблон в список Favorites (Избранное)
DNA Reference Library (Референсная библиотека ДНК)	Выберите hg19 (Human (hg19)) (референсный геном человека сборки hg19)
DNA Target Regions (Таргетные регионы ДНК)	Выберите Oncomine_Focus.20160219.designed.bed
DNA Hotspot Regions (Регионы горячих точек ДНК) ^[1]	None
Fusions Reference Library (Референсная библиотека химерных транскриптов)	Выберите Oncomine_Focus_designs_072117_Reference (Oncomine Focus RNA Reference 072117)
Fusions Target Regions (Таргетные регионы химерных транскриптов)	Выберите Oncomine_Focus_designs_072117_Reference.bed

[1] Не требуется для анализа ОнкоФокус. Оставьте это поле пустым, если файл **DNA Hotspot Regions** (регионы горячих точек ДНК) не используется.

8.3.1.5. Нажмите на вкладку **Ion Reporter**, затем выберите ваш аккаунт в ПО Ion Reporter.

ВНИМАНИЕ! Если аккаунт еще не создан, создайте аккаунт, для этого следуйте инструкциям в дополнении В.

8.3.1.6. В выпадающем списке **Existing Workflow** (Существующие протоколы), выберите **Oncomine Focus - 520 - w2.4 - DNA and Fusions - Single Sample**, затем нажмите **Next** (Далее).

8.3.1.7. На вкладке **Research Application step**, убедитесь, что **DNA and Fusions (Separate Libraries)** и **AmpliSeq DNA and Fusions** выбраны для **Application and Target Technique**, затем нажмите **Next** (Далее).

8.3.1.8. Во вкладке **Kits** (наборы):

Поле	Выбор	
	Ручная подготовка библиотек (ОнкоФокус 64)	Автоматическая подготовка библиотек (ОнкоФокус 32 авто)
Instrument (Секвенатор)	Ion GeneStudio S5 System	
Library Kit Type (Набор для создания библиотек)	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit	Ion AmpliSeq Kit for Chef DL8
Template Kit (Наборы для станции пробоподготовки)	Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit – Chef убедитесь, что выбран Ion Chef	
Sequencing Kit (Наборы для секвенирования)	Ion S5 Sequencing Kit	
Base Calibration Mode (Базовая калибровка)	Default Calibration (Калибровка по умолчанию)	
Chip Type (Тип чипа)	Ion 520 Chip	
Barcode Set (Набор баркодов)	Ion Xpress	IonCode Barcodes 1–32
Flows (Данные по каждой лунке со всеми подачами нуклеотидов)	400	

8.3.1.9. Выберите или измените необходимые для вашего запуска поля дополнительной информации, затем нажмите **Next** (Далее).

8.3.1.10. Зайдите на вкладки **Plugins** (Плагины) и **Projects** (Проекты). При необходимости выберите необходимые для вашего запуска настройки, затем нажмите **Next** (Далее).

8.3.1.11. На вкладке **Save** (Сохранить), нажмите на **Copy Template** (Скопировать шаблон), чтобы сохранить шаблон для нового запуска.

Пользовательский шаблон теперь станет доступен в окне **Templates** (Шаблоны) во вкладке **DNA and Fusions Research Application**. Если вы пометите пользовательский шаблон как **Favorites** (Избранный), он появится в списке избранных.

8.3.2. Создать Запланированный запуск из шаблона

8.3.2.1. Войдите в программное обеспечение системы «F-Genetics» Torrent Suite.

8.3.2.2. Во вкладке **Plan** (План), нажмите **Templates** (Шаблоны), затем выберите **DNA and Fusions** (ДНК и Химерные транскрипты) в левом меню навигации.

8.3.2.3. В списке **DNA and Fusions** (ДНК и Химерные транскрипты), выберите название запланированного запуска или выберите предустановленный системный шаблон. В столбце шаблонов выберите , затем выберите **Plan Run** (Запланировать запуск).

8.3.2.4. Введите или выберите следующую информацию. Номера строк в таблице соответствуют сноскам на рисунке ниже.

Сноска	Поле	Действие
1	Run Plan Name (Название Запланированного запуска)	Введите название Запланированного плана
2	Analysis Parameters (Параметры анализа)	Убедитесь, что выбран переключатель Default (Recommended) по умолчанию.
3	Use same reference & BED files for all barcodes (Используйте референтные и BED файлы для всех баркодов)	Убедитесь, что флажок установлен
4	Same sample for DNA and Fusions? (Один и тот же образец для ДНК и РНК?)	Убедитесь, что флажок установлен
5	Number of barcodes (Количество баркодов)	Введите количество баркодов, которые будут использоваться в этом запуске, затем нажмите кнопку  справа от этого поля (обычно используется 16 баркодов на чип)
6	Sample Tube Label (Этикетка на пробирке для образцов)	Введите баркоды пробирок для образцов библиотек, которые будут использоваться в ходе запуска на станции пробоподготовки
7	Chip Barcode (Баркод чипа)	Введите баркод с лицевой поверхности чипа
8	Oncology (Онкология)	Убедитесь, что флажок установлен

Template Name :
Generic Example Template

Run Plan Name (required) :

Analysis Parameters: ☒ Default (Recommended) ☐ Custom [Details](#)

Default Reference & BED Files

DNA Reference Library: Fusions Reference Library:

DNA Target Regions: Fusions Target Regions:

DNA Hotspot Regions:

☒ Use same reference & BED files for all barcodes

☒ Same sample for DNA and Fusions?

Number of barcodes : [+](#) [-](#)

Sample Tube Label :

Chio Barcode :

Enter a sample name for each barcode used (require at least one sample) [+](#) [-](#) [📄](#)

☒ Oncology ☐ Pre-implantation Genetic Screening

8.3.2.5. Укажите информацию об образце. Номера строк в таблице соответствуют сноскам на рисунке ниже.

Сноска	Поле ^[1]	Действие
1	Barcode (Баркод)	Для каждого образца из выпадающего списка выберите баркод , который будет идентифицировать его.
2	Sample Name (Название образца)	Введите название каждого образца. Мы рекомендуем, чтобы названия образцов были уникальными даже между разными запусками.
3	Control Type (expanded) (Тип контроля, выбрать из списка)	Выберите No Template Control из выпадающего списка справа, чтобы назначить отрицательный контроль ВАЖНО! Неверно установленный отрицательный контроль (NTC) приведет к сбою анализа в программном обеспечении Ion Reporter.
4	Sample ID (Идентификатор образца)	(Дополнительно) Нажмите на поле, затем введите идентификатор образца
5	Sample Description (Описание образца)	(Дополнительно) Нажмите на поле, затем введите описание образца
6	Annotations (Аннотации, выбрать из списка справа)	Нажмите, чтобы раскрыть поля Cancer Type (Тип опухоли) и Cellularity % (Объем клеточного содержимого)
7	Cancer Type (Тип рака)	(Дополнительно) Нажмите на поле, затем выберите из выпадающего списка. Нажмите  , чтобы скопировать запись во все строки
8	Cellularity % (насыщенность клетками)	Нажмите на поле, затем введите значение. Нажмите  чтобы скопировать запись во все строки
9	Ion Reporter Workflow (Протокол)	Убедитесь, что выбран правильный протокол

10	Relation	(Дополнительно) Нажмите на в поле и убедитесь, что автоматически заполнено правильное значение. Выберите из выпадающего списка, чтобы внести изменения
11	Gender (пол)	(Дополнительно) Нажмите на поле, затем выберите из выпадающего списка. Нажмите  , чтобы скопировать запись во все строки
12	IR Set ID (Идентификатор группировки образцов)	Идентификатор IR Set связывает ДНК и РНК каждого образца для его анализа. Убедитесь, что автоматически заполненное значение уникально для каждого образца. Выберите из выпадающего списка, чтобы внести изменения

[1] Нажмите на заголовки столбцов (Тип контроля, Референс, Аннотации), чтобы открыть дополнительные столбцы.

#	Barcode	Sample Name (required)	Control Type	Sample ID	Sample Description	DNA/Fusions	Reference Annotations
1	IonXpress_001 (CTAAGGTAAC) ▼	Sample 1	No Template Control ▼			DNA	
2	IonXpress_002 (TAAGGAGAAC) ▼	Sample 1	No Template Control ▼			Fusions	
3	IonXpress_003 (AAGAGGATTC) ▼	Sample 2				DNA	
4	IonXpress_004 (TACCAAGATC) ▼	Sample 2				Fusions	
5	IonXpress_005 (CAAGAAGGAAC) ▼						

Reference Annotations	Cancer Type	Cellularity %	Ion Reporter Workflow	Show All Workflows	Relation	Gender	IR Set ID
		100	OncoPrint Focus v2.4 - DNA and Fusions - Single Sample (DNA_RNA hg19 Ion Torrent) ▼		Self ▼		1
		100	OncoPrint Focus v2.4 - DNA and Fusions - Single Sample (DNA_RNA hg19 Ion Torrent) ▼		Self ▼		1
	Non-Small Cell Lung Cancer ▼	20	OncoPrint Focus v2.4 - DNA and Fusions - Single Sample (DNA_RNA hg19 Ion Torrent) ▼		Self ▼		2
	Non-Small Cell Lung Cancer ▼	20	OncoPrint Focus v2.4 - DNA and Fusions - Single Sample (DNA_RNA hg19 Ion Torrent) ▼		Self ▼		2
			OncoPrint Focus v2.4 - DNA and Fusions - Single Sample		Self ▼		

8.3.2.6. Нажмите **Plan Run** (Запланировать запуск).

Запуск находится в списке запланированных запусков под указанным вами именем и автоматически используется станцией пробоподготовки, когда на станцию загружается соответствующая пробирка с библиотекой.

8.4. Запуск станции пробоподготовки для подготовки матрицы

Действия перед началом работы

Перед началом использования станции пробоподготовки

- Убедитесь в том, что станция пробоподготовки очищена после предыдущего рабочего цикла. В противном случае очистите станцию перед загрузкой материалов.
Примечание: Чтобы получить дополнительную информацию о методах очистки, смотрите 8.6.3. Очистка станции пробоподготовки.
- Проверьте пустые отделения для реагентов и растворов на предмет наличия конденсата. Конденсат может собираться в этих отделениях при определенных условиях температуры и влажности. Прежде чем загрузить расходные материалы в изделие, протрите отделения лабораторной салфеткой или абсорбирующей тканью, если необходимо.
- Убедитесь в том, что станция пробоподготовки подключена к серверу «Torrent Server». В главном окне станции нажмите **Settings (Настройки)**, а затем «Torrent Server» для того, чтобы проверить статус подключения вашего изделия.

Необходимые материалы

Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
Картридж «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
Картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки ((входит в состав набора «ОнкоФокус»)
Полупроводниковый чип 520 (входит в состав набора «ОнкоФокус»)
Вода без нуклеаз
Дозаторы 10 мкл и 200 мкл и наконечники с фильтром

8.4.1. Подготовка расходных материалов

Распакуйте **Картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки** за 45 минут перед использованием. Подождите, пока картридж нагреется до комнатной температуры.

ВНИМАНИЕ! Картридж с реагентами должен выдерживаться в течение 45 минут при комнатной температуре перед использованием.

Извлеките другие картриджи и материалы из упаковки. Затем разместите их на столе рядом со станцией пробоподготовки.

Подготовьте следующие позиции:

- Адаптер для чипов (2 шт.)
- Штатив с пробирками для модуля обогащения
- Наконечники в штативе
- Планшет с профольгированной крышкой
- Крышки для центрифуг (2 шт.)
- Пробирки (12 шт.)

- Картридж «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки
- Картридж «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки

ВНИМАНИЕ! Перед использованием, аккуратно постучите по картриджу с реагентами и картриджу с растворами для того, чтобы реагенты переместились на дно пробирки.

Встряхните пробирку с NaOH (Позиция С на картридже с реагентами) на вортексе чтобы собрать содержимое пробирки.

Примечание: При хранении в нормальных условиях в некоторых пробирках картриджа с реагентами может выпадать осадок. Если осадок присутствует, загрузите картридж, как указано в инструкции. Осадок растворяется, когда реагенты смешиваются во время использования прибора.

8.4.1.1. Добавление библиотек в пробирки для образцов

С помощью дозатора перенесите по 25 мкл каждой разбавленной библиотеки на дно пробирок для образцов библиотек (пробирок с штрихкодами), находящихся в положении А и В на картридже с реагентами.

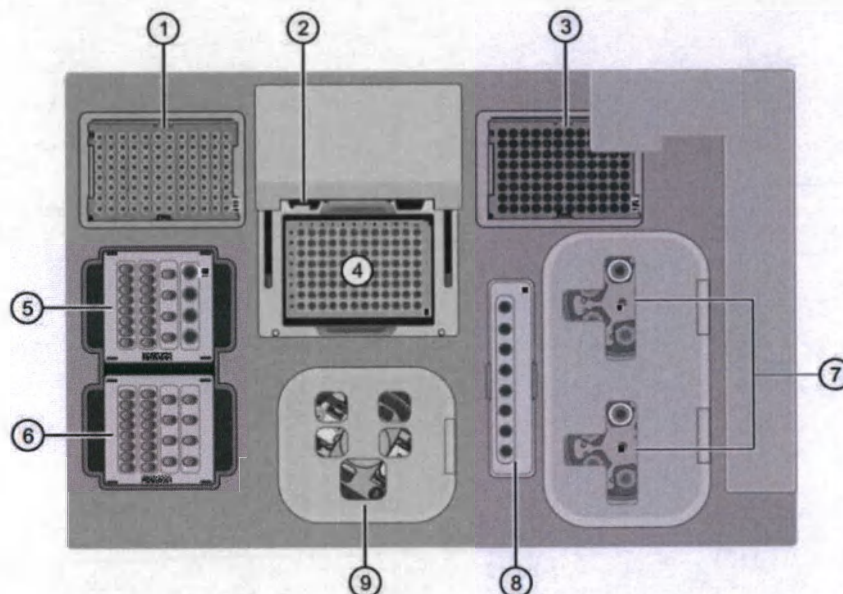
Закройте крышками пробирки с образцами библиотек и храните их во льду до тех пор, пока вы не будете готовы загрузить пробирки в картридж с реагентами и в станцию пробоподготовки.

8.4.2. Загрузка станции пробоподготовки

ВАЖНО! • Режимы номинальной частоты вращения центрифуги предназначены для предоставленных люлек и рекомендованных чипов, пробирок и реагентов для подготовки образцов.

- Центрифуга для загрузки чипа предназначена для работы при указанных частотах вращения, которые подходят для определенных люлек, чипа, адаптера и противовеса для чипов. Центрифуга должна быть сбалансирована по нагрузке. Необходимо предпринять меры, чтобы надлежащим образом загрузить люльку. В случае высокого уровня вибрации, убедитесь в том, что все компоненты правильно установлены и роторы правильно сбалансированы.
- Используйте только материалы, которые входят в набор реагентов «ОнкоФокус», для номинальной частоты вращения центрифуги. Не снимайте или не заменяйте роторы. Проверяйте люльки перед каждым использованием для того, чтобы обеспечить нормальную работу.
- Убедитесь в том, что изделие включено и было очищено после последнего использования.
- Убедитесь в том, что все компоненты очищены и высохли перед загрузкой в станцию пробоподготовки.
- Убедитесь в том, что компоненты станции для реагентов и растворов являются сухими и не содержат конденсата перед загрузкой компонентов.

Выполните нижеописанные процедуры для того, чтобы загрузить станцию пробоподготовки. Полностью загруженная станция показана на рисунке ниже:

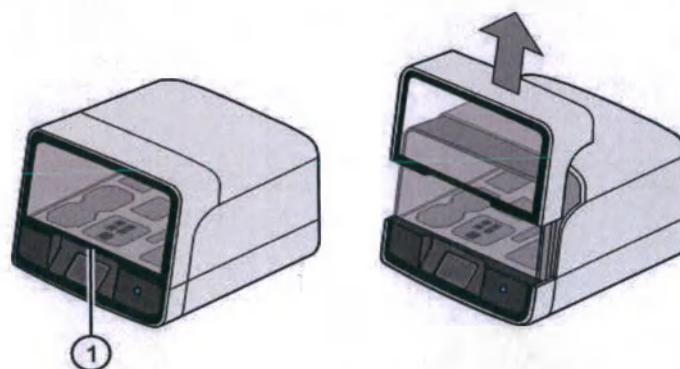


- (1) Новый штатив с наконечниками
- (2) Профольгированная крышка (установлена)
- (3) Штатив для пустых наконечников (перемещен из позиции с новым штативом (1)).
- (4) Планшет 96-луночный
- (5) Картридж «ОФ» с реагентами
- (6) Картридж «ОФ» с растворами для амплификации библиотек
- (7) Центрифуги для регенерации (извлечения образцов): пробирки и крышки для центрифуг
- (8) Штатив с пробирками для модуля обогащения
- (9) Центрифуга для загрузки чипа: Адаптер/ чип – 2 шт.

8.4.2.1. Загрузка штативов с наконечниками и планшета для ПЦР

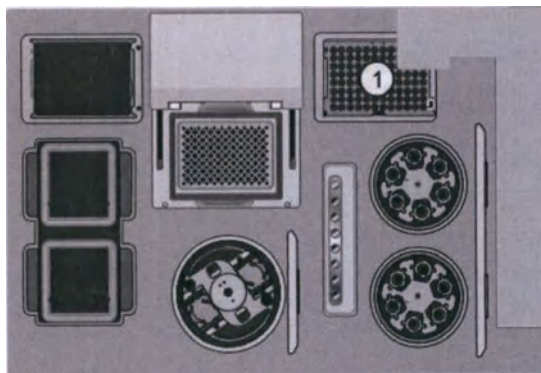
8.4.2.1.1. Нажмите кнопку  (Открыть дверцу) на сенсорном экране изделия для того, чтобы оторвать дверцу. Затем подождите, пока защелка не откроется.

8.4.2.1.2. Поднимайте дверцу прибора вверх до тех пор, пока не сработает механизм блокировки.



(1) Нажмите здесь, затем поднимите.

8.4.2.1.3. Установите пустой штатив из-под наконечников от предыдущего запуска в положение «Использованные наконечники». Затем смените перчатки.



Положение (1) «Использованные наконечники»

ВНИМАНИЕ!

- Убедитесь, что в пустом штативе, находящимся в положении «Использованные наконечники», нет наконечников. Прибор отменит цикл, если наконечники находятся в положении «использованные».

- Для того, чтобы предотвратить загрязнение, следует незамедлительно менять перчатки после перемещения пустого штатива в положение «Использованные наконечники»

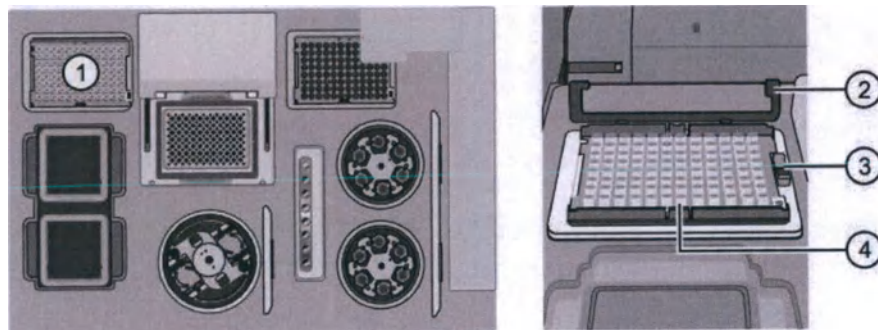
Примечание: Небольшое количество сухого остатка может оставаться в кювете пустого штатива после рабочего цикла. Это не повлияет на последующие циклы в положении «Использованные наконечники».

8.4.2.1.4. Распакуйте новый штатив с наконечниками и снимите крышку для того, чтобы открыть наконечники. Затем установите в положение «Новые наконечники».

Примечание: Два прокалывающих наконечника предварительно устанавливаются в положение G7 и H7 на штативе с наконечниками.

Примечание: Сохраните крышку для дальнейшего использования.

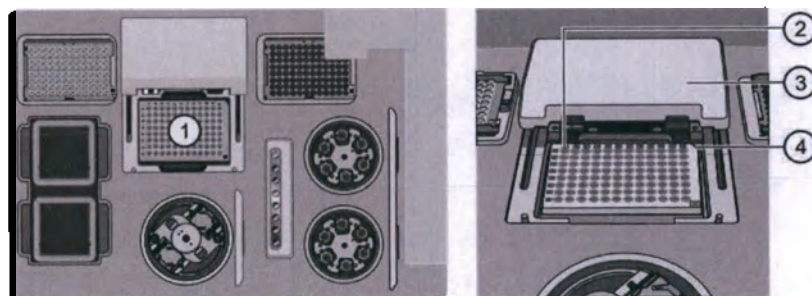
8.4.2.1.5. Переместите защелку вперед для того, чтобы поднять зажимную скобу. Разместите штатив с наконечниками в положение «Новые наконечники». Опустите скобу, затем переведите защелку в заднее положение для того, чтобы зафиксировать штатив в определенном положении.



- (1) Положение новых наконечников.
- (2) Скоба
- (3) Защёлка
- (4) Новый штатив с наконечниками

8.4.2.1.6. Загрузите планшет 96-луночный в блок для образцов термоциклера. Затем вставьте новую профольгированную крышку под автоматическую нагреваемую крышку.

ВНИМАНИЕ! Когда профольгированная крышка установлена правильно, ее упоры направлены вверх и контактируют с нагреваемой крышкой.



- (1) Блок для образцов термоциклера
- (2) Лунка A1
- (3) Крышка
- (4) Закрепленный угол.

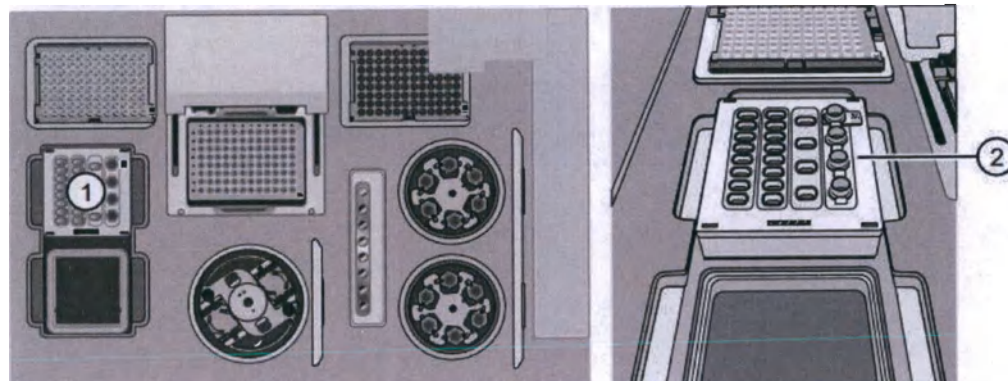
8.4.2.2. Загрузка картриджей с реагентами и растворами

ВНИМАНИЕ! Разморозьте картридж с реагентами при комнатной температуре в течение 45 минут перед использованием.

8.4.2.2.1. Аккуратно постучите по картриджу с реагентами на столе для того, чтобы реагенты собрались на дне пробирок.

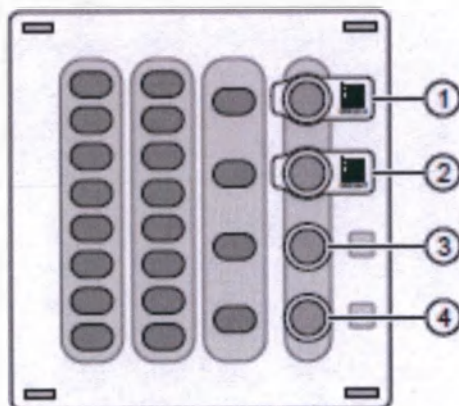
8.4.2.2.2. Загрузите картридж в станцию для реагентов таким образом, чтобы он прочно зафиксировался в необходимом положении и располагался ровно на платформе.

ВНИМАНИЕ! При установке картриджей не применяйте чрезмерное усилие. Для каждого картриджа предусмотрено только одно место и положение на платформе. Если картридж не подходит, убедитесь в том, что вы устанавливаете соответствующие картриджи в правильном положении.



- 1. Станция для реагентов (4°C)
- 2. Картридж с реагентами

8.4.2.2.3. Снимите колпачки с пробирок с образцами библиотек, которые содержат по 25 мкл разведенных библиотек, и установите их в позиции A и B на картридже с реагентами.



- (1) Позиция А (Пробирка для образцов библиотек)
- (2) Позиция В (Пробирка для образцов библиотек)
- (3) Позиция С (NaOH)
- (4) Позиция D (Пустая пробирка)

ВНИМАНИЕ! Расположите пробирки с образцами библиотек таким образом, чтобы баркоды были видны и ориентированы вправо. Убедитесь, что с пробирок с образцами библиотек сняты крышки.

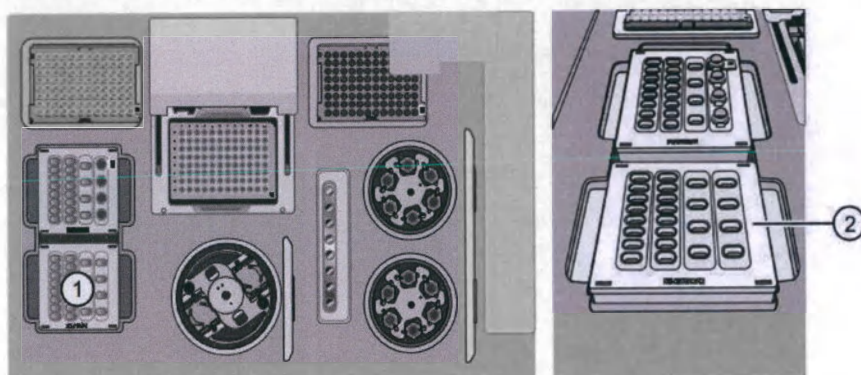
8.4.2.2.4. Снимите колпачок с пробирки с NaOH которая находится в позиции С, а также с пустой пробирки в позиции D.

ВНИМАНИЕ! Во время загрузки картриджей с реагентами:

- Прижмите пробирку для образцов библиотек для того, чтобы она прочно зафиксировалась в картридже.
- Убедитесь в том, что со всех четырех пробирок сняты колпачки.

8.4.2.2.5. Аккуратно постучите по картриджу с растворами для того, чтобы реагенты опустились на дно пробирок.

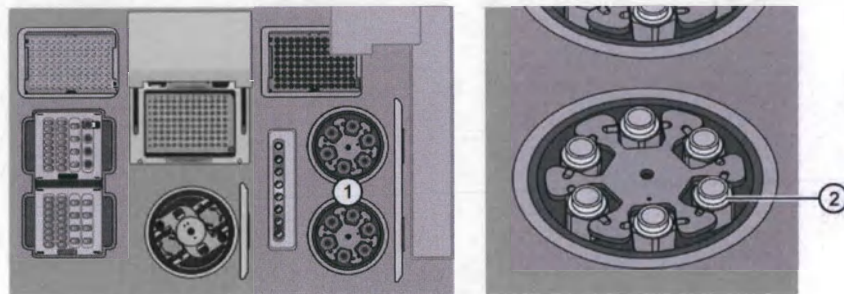
8.4.2.2.6. Установите картридж с растворами в станцию для растворов таким образом, чтобы он был на одном уровне с платформой.



- (1) Станция для растворов (комнатная температура)
- (2) Картридж с растворами

8.4.2.3. Загрузка пробирок и штатива с пробирками для модуля обогащения

8.4.2.3.1. Установите по шесть пробирок в каждую центрифугу для регенерации (извлечения образцов).



(1) Центрифуга для регенерации (извлечения образцов)
(2) Пробирки

Перед закрытием каждой центрифуги крышкой, проверьте что:

- Центрифуга сбалансирована по нагрузке с использованием всех необходимых материалов.

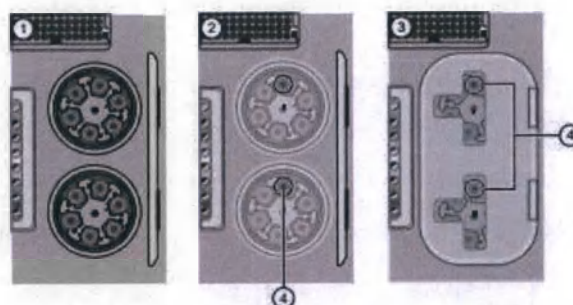
ВНИМАНИЕ! Центрифуга должна быть сбалансирована по нагрузке.

- Люльки надежно закреплены в роторах центрифуги.
- Люльки установлены в правильном положении в центрифуге, и центробежная сила при вращении направлена от центра.

8.4.2.3.2. Установите крышку на каждую центрифугу, отрегулировав положение крепления таким образом, что оно совпадало с углублением на платформе. Затем вставьте ее в нужное положение. Убедитесь в том, что крышки полностью вставлены, слегка нажимая на них вдоль всего периметра.

8.4.2.3.3. Закройте откидную крышку центрифуги для регенерации (извлечения образцов).

. Убедитесь в том, что порт крышки размещен в направлении задней части прибора.



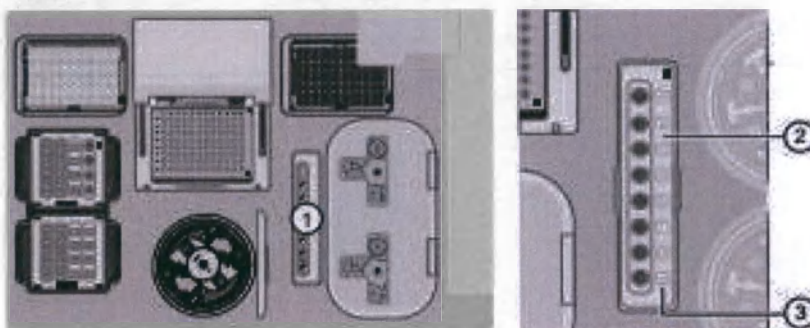
(1) Установленные пробирки
(2) Установленные крышки для центрифуг
(3) Закрытая крышка центрифуги для регенерации (извлечения образцов)
(4) Порт

ВНИМАНИЕ! Не ставьте какие-либо предметы на крышку центрифуги.

ВНИМАНИЕ! Используйте только поставленные материалы, включая люльки и расходные материалы для того, чтобы обеспечить работу центрифуги при номинальной частоте вращения. Не снимайте или не заменяйте роторы. Чтобы обеспечить нормальную работу, проверяйте люльки перед каждым использованием.

8.4.2.3.4. Установите штатив с пробирками для модуля обогащения. Затем прижмите штатив для того, чтобы он был на одном уровне с платформой.

ВНИМАНИЕ! Убедитесь в том, штатив с пробирками для модуля обогащения расположен таким образом, что буквенные обозначения находятся с правой стороны штатива.



- (1) Станция для обогащения
- (2) Штатив с пробирками для модуля обогащения
- (3) Буквенные обозначения

8.4.2.4. Загрузка центрифуги для загрузки чипов

8.4.2.4.1. Установите каждый чип для секвенирования в люльку центрифуги. Затем прикрепите адаптеры для чипов к устройству.

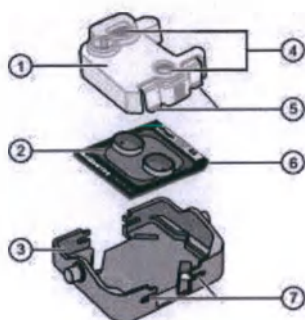
Примечание: (опционально) Пометьте верхнюю сторону чипов для того, чтобы иметь возможность их идентифицировать. Не закрывайте баркод чипа.

а. Разместите чип в люльке для загрузки чипов. Затем выровняйте лунки адаптера для чипа по отношению к лункам чипа, расположив адаптер на чипе в таком положении, чтобы был виден баркод.

б. Разместите адаптер на чипе. Затем вставьте встроенные крепежи на конце адаптера в разъемы люльки.

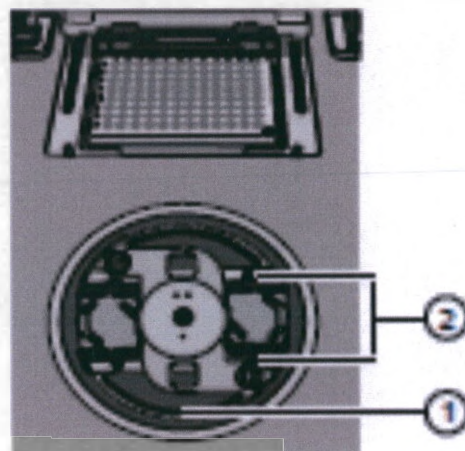
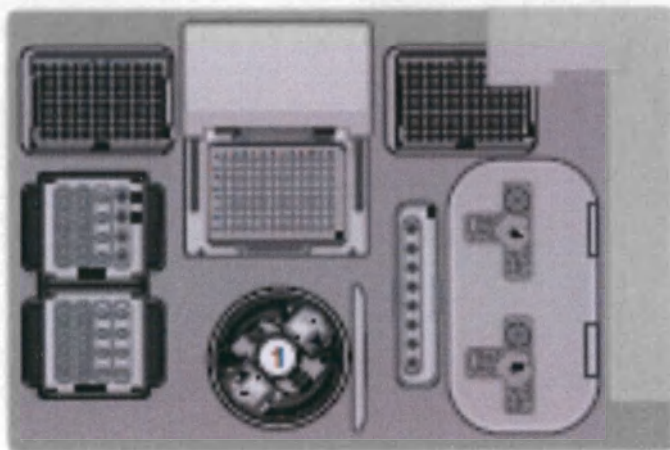
в. Аккуратно прижимайте гибкие крепежи на другом конце адаптера к разъемам люльки до тех пор, пока адаптер не зафиксируется в определенном положении.

г. Убедитесь в том, что крепежи на всех четырех углах адаптера вставлены в разъемы люльки центрифуги. Установка будет считаться неверной, если адаптер прикреплен непрочно.

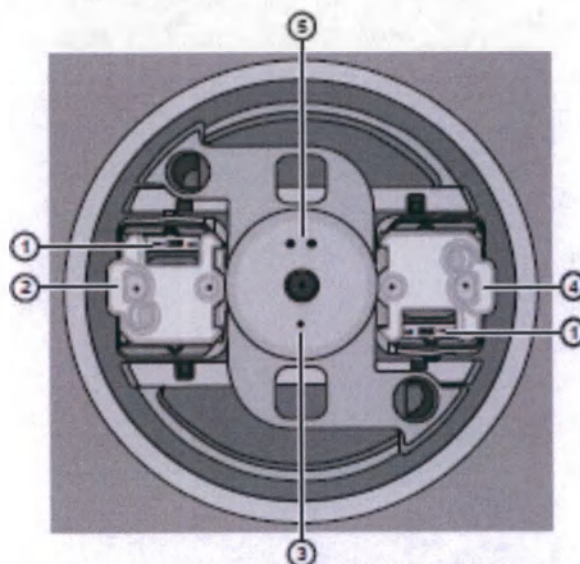


- 1. Адаптер для чипа
- 2. Чип
- 3. Люлька
- 4. Порты (выровнены по отношению к чипу)
- 5. Крепежи
- 6. Закрепленный угол (выровнен по отношению к люльке)
- 7. Разъемы

8.4.2.4.2. Установите конструкции адаптер /чип/люлька на центрифуге для загрузки чипов.



- (1) Центрифуга для загрузки чипов
(2) Разъемы



- (1) Баркод чипа
(2) Позиция А чипа
(3) Позиция А отверстие
(4) Позиция В чипа
(5) Позиция В отверстие

Примечание: Позиция А на центрифуге для загрузки чипов – это позиция, расположенная при вращении на 90° по часовой стрелке относительно единственного отверстия на крышке люльки ротора в покое. В чип, установленный в позиции А, загружаются частицы, подготовленные из библиотек ДНК/РНК в пробирке для образцов библиотек, размещенной в позиции А на картридже с реагентами. В чип, установленный в позиции В, загружаются частицы, подготовленные из библиотек ДНК в пробирке для образцов библиотек, размещенной в позиции В на картридже с реагентами.

ВНИМАНИЕ! Если центрифуга для загрузки чипов установлена, убедитесь в том, что адаптеры для чипов прочно прикреплены к люлькам, и каждая люлька прочно закреплена на роторах центрифуги.

8.4.2.4.4. Убедитесь в том, что центрифуга сбалансирована по нагрузке, люльки для чипа прочно закреплены и расположены на центрифуге таким образом, что при соприкосновении они поворачиваются наружу на 90°. Затем закройте крышку центрифуги для загрузки чипа.

Версия 25.02.2022

ВНИМАНИЕ! Не ставьте какие-либо предметы на крышку.

8.4.2.5. Проверка правильности установки материалов

Прежде чем продолжить работу:

- Убедитесь в том, что каждый картридж находится в правильном месте и имеет верное расположение.
- Нажмите на каждый картридж для проверки надёжности их установки.
- Убедитесь в том, что с пробирок в картридже с реагентами сняты колпачки, а сами пробирки надёжно закреплены.
- Убедитесь в том, что крышки центрифуги правильно установлены; порт должен быть направлен в сторону задней части изделия.
- Убедитесь в том, что люльки для чипов и пробирок правильно установлены в кронштейнах роторов центрифуг для загрузки чипов и центрифуг для регенерации (извлечения образцов), а также в том, что расходные материалы правильно расположены.



ВНИМАНИЕ! Для того, чтобы обеспечить правильное и безопасное положение необходимо убедиться в том, что все материалы правильно установлены на платформе перед началом рабочего цикла. Станция пробоподготовки не проверяет все нюансы установки материалов перед началом каждого рабочего цикла.

8.4.2.6. Загрузка одного чипа

При применении варианта исполнения набора «ОнкоФокус 64» вы можете запустить станцию пробоподготовки, установив один чип вместо двух, используя противовес для чипа, установленный напротив чипа в центрифуге для загрузки чипов. Противовес для чипа входит в состав системы для высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics».

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано на использование двух чипов за запуск. Расход реагентов при использовании одного или двух чипов одинаков. Таким образом, при загрузке одного чипа второй чип остается неиспользованным, а количество образцов, проанализированных с помощью набора, сокращается.

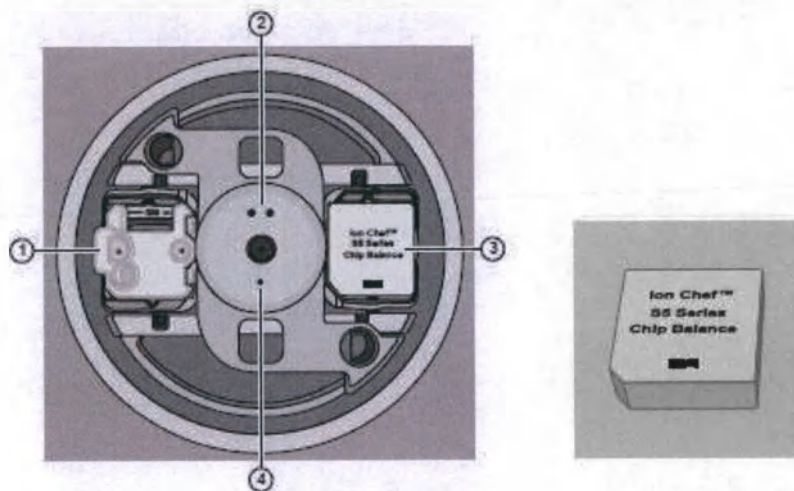
При применении варианта исполнения набора «ОнкоФокус 32 авто» всегда используется один чип вместе с противовесом для чипа, установленного напротив чипа в центрифуге для загрузки чипов. Противовес для чипа входит в состав системы для высокопроизводительного секвенирования «F-Genetics».

Загрузите станцию пробоподготовки обычным образом. Для установки одного чипа выполните следующие действия:

8.4.2.6.1. Перенесите одну разбавленную библиотеку в пробирку для образцов библиотек в позиции А картриджа для реагентов.

8.4.2.6.2. Установите пустую пробирку в позицию В картриджа для реагентов. Снимите крышки с обеих пробирок.

8.4.2.6.3. Загрузите чип в Позицию А и противовес для чипа в Позицию В в центрифугу для загрузки чипов.



- (1) Позиция А (Чип)
- (2) Позиция В отверстия
- (3) Позиция В (Противовес для чипов)
- (4) Позиция А отверстие

8.4.2.6.4. Далее проведите операции проверки установки чипа в пункте 8.4.2.6.3. Станция пробоподготовки детектирует наличие одного чипа во время сканирования платформы перед запуском станции.

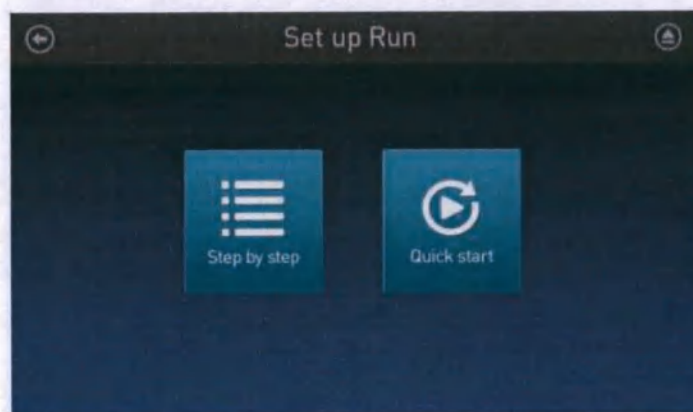
8.4.2.7. Запуск станции пробоподготовки

8.4.2.7.1. Убедитесь в том, что вы загрузили станцию пробоподготовки всеми картриджами, материалами и чипами.

8.4.2.7.2. В главном окне станции нажмите кнопку **«Set up run» (Настройка запуска)**.

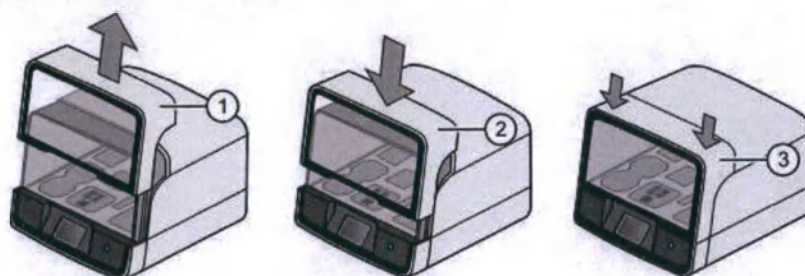


8.4.2.7.3. Нажмите кнопку **«Step by Step» (Поэтапно)** для того, чтобы поэтапно настроить станцию или нажмите кнопку **«Quick Start» (Быстрый запуск)** для того, чтобы пропустить окна настройки станции.



8.4.2.7.4. Следуйте инструкциям на экране. В случае появления соответствующего сообщения, закройте дверцу прибора, сначала подняв ее для разблокировки. Затем опускайте дверцу, пока замок не заблокируется. После закрытия дверцу, активируется система изображения.

ВНИМАНИЕ! Не закрывайте дверцу, просто опустив ее вниз. Вы должны слегка поднять дверцу, прежде чем закрыть ее. Убедитесь в том, что обе стороны дверцы заблокированы после закрытия.



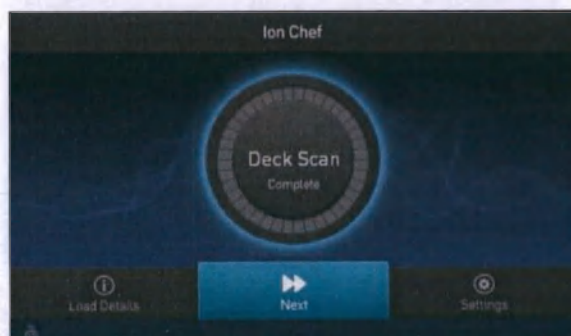
- (1) Сначала поднимите дверцу
- (2) Опустите дверцу
- (3) Прижмите, чтобы заблокировать

8.4.2.7.5. При появлении соответствующего сообщения, нажмите кнопку **«Start check» (Начать проверку)** для того, чтобы начать сканирование платформы. Прибор сканирует штрих-коды всех расходных материалов и реагентов с целью проверки их наличия и совместимости.

Примечание: Во время сканирования платформы на сенсорном экране появится предупреждение, если станция пробоподготовки определяет отсутствующие или несовместимые расходные материалы. Вы должны устранить все проблемы, указанные в предупреждениях, перед началом работы. После устранения всех проблем, нажмите кнопку **«Yes» (Да)** чтобы продолжить.

ВНИМАНИЕ! Функция сканирования платформы не заменяет ручную проверку реагентов и материалов в станции пробоподготовки перед началом работы. Для того, чтобы обеспечить надлежащую и безопасную работу станции, убедитесь в том, что все материалы установлены правильно, прежде чем продолжить работу.

8.4.2.7.6. По завершении сканирования платформы нажмите кнопку **«Next» (Далее)** для того, чтобы вывести на экран окно **«Data Destination» (Данные для передачи)**.

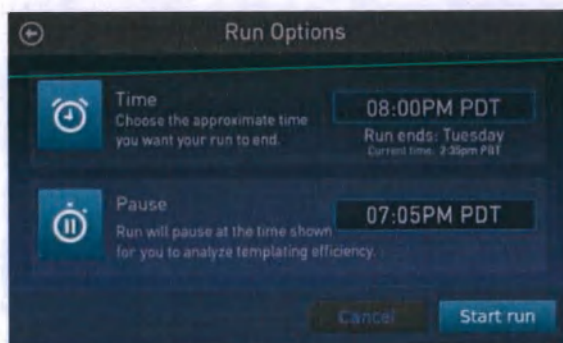


8.4.2.7.7. Убедитесь в том, что прибор отображает верный тип набора, тип чипа, штрих-код чипа, и запланированный запуск. Если на экране не отображается правильный Запланированный запуск, откройте ниспадающее меню , чтобы выбрать необходимый Запланированный запуск. Затем нажмите кнопку «Next» (Далее).



ВНИМАНИЕ! Если неверно указан тип чипа и набора, подтвердите, что вы используете верный набор и чип. Если вы используете правильный набор или чип, и на экране отображается неверный тип чипа или набора, свяжитесь с Отделом технической поддержки.

8.4.2.7.8. В окне «Run Options» (Варианты работы) выберите необходимую опцию. Затем, если необходимо, введите время окончания рабочего цикла после нажатия на правом поле, в котором отображается время рабочего цикла. При этом на экране появится диалоговое окно для ввода времени окончания рабочего цикла.



Станция пробоподготовки предоставляет два варианта получения образцов контроля качества, которые могут использоваться для оценки эффективности подготовки матрицы. В зависимости от выбранной опции образец контроля качества будет доступен во время или после рабочего цикла. В обоих случаях вы можете получить необогащенный образец из пробирки для образцов библиотек, расположенной в позиции А на картридже с реагентами или обогащенный образец в позиции Е на штативе с пробирками для станции обогащения.

Выбрав	Вы можете получить образцы контроля качества	Приблизительное время после начала цикла
Время	Сразу после завершения рабочего цикла в указанное вами время:	4 часа 50 минут
Пауза	Когда прибор прекращает работу перед загрузкой чипа:	4 часа 15 минут ^[1]

^[1] Для загрузки чипа необходим 1 дополнительный час. Общее время работы увеличивается, так как необходим дополнительный этап конфигурации, если выбрана опция «Пауза»

Примечание: Выберите опцию **«Pause» (Пауза)**, если вы не уверены в качестве библиотеки и желаете оценить эффективность подготовки матрицы перед загрузкой чипа. Если вы не приостанавливаете рабочий цикл, вы можете собрать образцы контроля качества по завершении данного цикла. Храните образцы до тех пор, пока не завершится секвенирование с целью их использования для поиска и устранения неисправностей.

8.4.2.7.9. В окне **«Run Options» (Опции запуска)** нажмите кнопку **«Start run» (Старт запуска)** для того, чтобы начать запуск.

Примечание: Если вы должны остановить рабочий цикл по какой-либо причине, нажмите кнопку **«Cancel» (Отмена)**, а затем кнопку **«Yes» (Да)** для того, чтобы подтвердить отмену.

Если во время работы станции пробоподготовки возникают проблемы, работа прекращается и на экране появляется ошибка. Если запуск прерван:

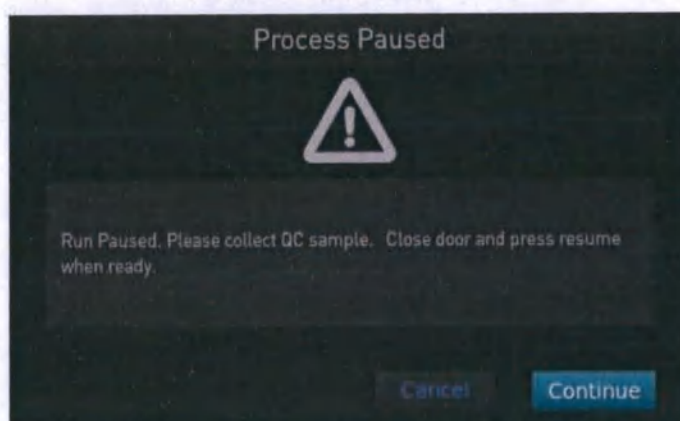
1. Уберите расходные материалы с платформы, очистите прибор. Если возможно, сохраните расходные материалы с целью их использования при поиске и устранении неисправностей.

2. Перезапустите станцию и повторно начните запуск. Если при этом запуск не завершится успешно, свяжитесь с Отделом технической поддержки с целью поиска и устранения неисправности, зафиксируйте сообщение об ошибке, сфотографировав сенсорный экран.

8.4.2.7.10. Инициализируйте секвенатор, по меньшей мере, за 50 минут до завершения загрузки чипа в станцию пробоподготовки.

8.4.2.7.11. Если вы приостанавливаете запуск для анализа эффективности подготовки матрицы, уберите тестируемый образец, если появляется соответствующее требование на станции пробоподготовки (приблизительно 4 часа 15 минут).

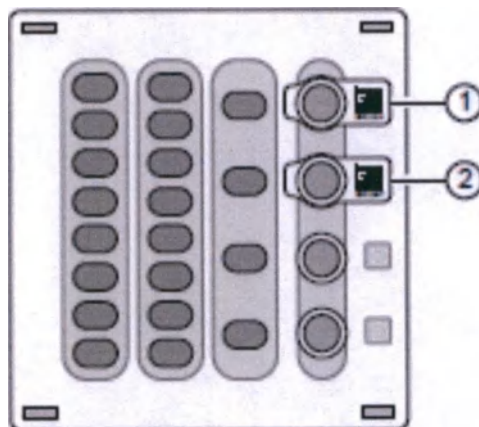
а. Если появляется соответствующее сообщение, требующее удалить образец контроля качества, откройте дверцу прибора.



б. Перенесите образец контроля качества (весь объем) с позиции А картриджа с реагентами на платформе прибора в новую промаркированную микроцентрифужную пробирку.

ВНИМАНИЕ! Не снимайте пробирку для образца библиотеки с картриджа с реагентами.

ВНИМАНИЕ! Если вы ненамеренно закрыли дверцу перед получением образцов контроля качества, следует подождать завершения рабочего цикла, прежде чем вы сможете собрать их. Вы не можете приостанавливать запуск или открывать дверцу после того, как она закрывается.



(1) Позиция А (образец контроля качества)

(2) Позиция В (образец контроля качества)

в. Если вы проводите оценку качества обогащенного образца, перенесите образец контроля качества с позиции Е штатива с пробирками для модуля обогащения в новую промаркированную микроцентрифужную пробирку.

г. Проанализировать образец контроля качества можно с использованием методом цитометрии в соответствии с инструкцией по применению прибора.

е. Закройте дверцу прибора и нажмите кнопку «Continue» (Продолжить) для того, чтобы завершить запуск.

8.4.2.7.12. После завершения запуска выгрузите станцию пробоподготовки и сразу проведите процедуру секвенирования чипов. Вы можете собрать образцы контроля качества из картриджей с реагентами и/или картриджей для обогащения, если вы этого еще не сделали.

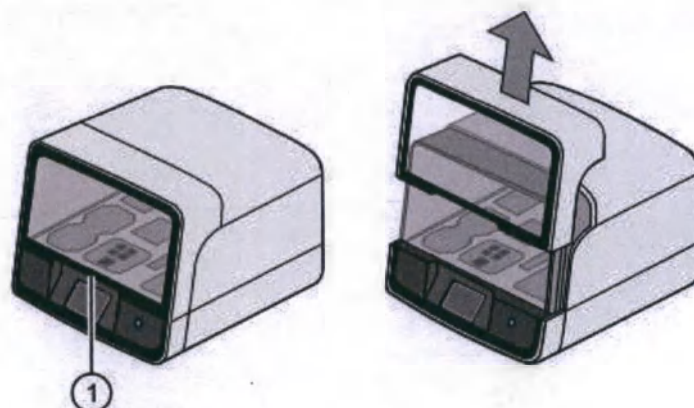
Примечание: вы не можете сразу проводить процедуру секвенирования загруженного чипа. Поместите чип в отдельный контейнер и храните его при температуре 4°C до тех пор, пока вы не будете готовы секвенировать его (максимум до 6-8 часов).

8.4.2.8. Выгрузка чипов для секвенирования

8.4.2.8.1. Откройте дверцу станции:

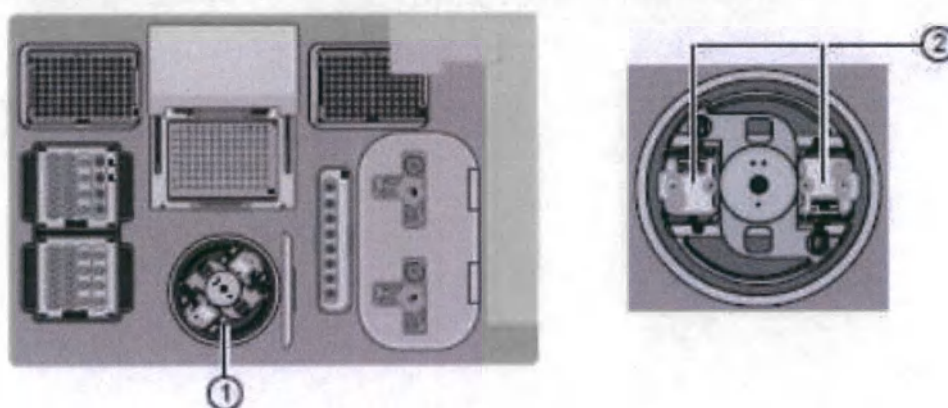
а. На сенсорном экране станции, нажмите  (Откройте дверцу). Затем подождите, пока защелка не откроется.

б. Поднимайте дверцу станции вверх до тех пор, пока не сработает механизм блокировки.



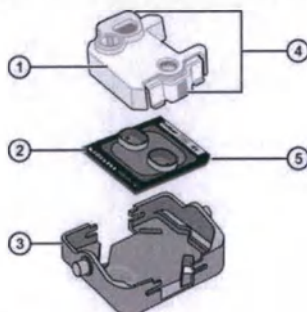
(1) Нажмите здесь, затем поднимите.

8.4.2.8.2. Откройте крышку центрифуги для загрузки чипа. Затем снимите конструкции адаптер/чип/люлька со станции пробоподготовки.



(1) Центрифуга для загрузки чипа
(2) Снять

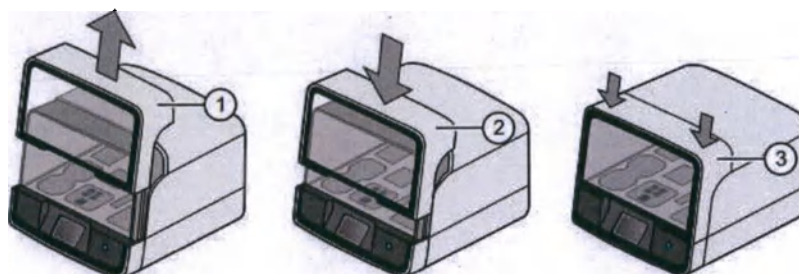
- а. Снимите блок адаптер/чип/люлька с центрифуги для загрузки образцов.
- б. Прижмите оба конца адаптера для чипа. Затем снимите его.
- в. Возьмите чип за края, аккуратно выньте его из люльки и положите на чистую поверхность. Затем установите люльку обратно в центрифугу для загрузки чипа.



(1) Адаптер для чипа
(2) Чип
(3) Люлька
(4) Прижмите и снимите адаптер
(5) Аккуратно снимите

8.4.2.8.3. Закройте дверцу станции, сначала слегка подняв ее для разблокировки. Затем опустите дверцу и прижимайте ее до тех пор, пока замок не заблокируется.

ВНИМАНИЕ! Не закрывайте дверцу, просто опустив ее вниз. Вы должны слегка поднять дверцу, прежде чем закрыть ее. Убедитесь в том, что обе стороны дверцы заблокированы после закрытия.



- (1) Сначала поднимите дверцу
- (2) Опустите дверцу
- (3) Прижмите для того, чтобы закрыть

8.4.2.8.4. Загрузите чип в секвенатор и сразу начните процедуру секвенирования. Если вы не можете сразу начать процедуру секвенирования или планируете секвенировать одновременно два чипа, поместите чип в отдельный контейнер и храните при температуре 4°C, пока вы не будете готовы секвенировать его (максимум до 6-8 часов).

ВНИМАНИЕ! Если вы хранили загруженные чипы, достаньте чип из контейнера и поместите его на чистую поверхность в темное помещение для того, чтобы нагреть его до комнатной температуры в течение, минимум, 20 минут перед началом запуска.

8.5. Инициализация секвенатора

8.5.1. Положения компонентов секвенатора

Необходимые материалы

Набор растворов «ОФ» для секвенирования (входит в состав набора «ОнкоФокус»)

Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (входит в состав набора «ОнкоФокус»)

Противовес для чипов (входит в состав системы «F-Genetics»)

Вода без нуклеаз

Дозаторы 10 мкл и 200 мкл и наконечники с фильтром

Емкость для отходов (входит в состав системы «F-Genetics»)



- (1) Сенсорный экран
- (2) Кнопка включения
- (3) Картридж с реагентами для секвенирования
- (4) Зажим для чипа
- (5) Бутыль с промывочным раствором. Емкость для отходов, расположенная за бутылкой с промывочным раствором (показано справа)
- (6) Бутыль с раствором для очистки
- (7) Емкость для отходов

Примечание: в системе используется технология радиочастотной идентификации (РЧИД) для проверки размещения необходимых реагентов в позициях 3, 5 и 6. Если срок годности реагентов истек или счетчик использования выводит ошибку, на экране появится сообщение об ошибке с требованием заменить реагент перед началом запуска.

8.5.2. Действия перед началом работы

Секвенаторы «F-Genetics Плюс» и «F-Genetics» могут проверять совместимость каждого чипа и расходного материала, которые загружаются во время инициализации и секвенирования, а также срок годности данных компонентов. Для того чтобы предотвратить исключения во время инициализации, проверьте информацию о каждом расходном материале перед загрузкой в прибор.

- Распакуйте картридж с реагентами для секвенирования за 45 минут перед использованием. Подождите, пока картридж нагреется до комнатной температуры.

Версия 25.02.2022

Не доставляйте картридж с реагентами для секвенирования из упаковки, если вы не собираетесь его использовать, чтобы можно было вернуть неиспользуемый картридж в место для хранения в случае отсрочки цикла секвенирования.

- Распакуйте раствор для очистки. Переверните сосуд 5 раз. Затем покрутите сосуд под углом для того, чтобы тщательно смешать содержимое.
- Снимите красные колпачки с бутылей с промывочным раствором и раствором для очистки непосредственно перед установкой на прибор.

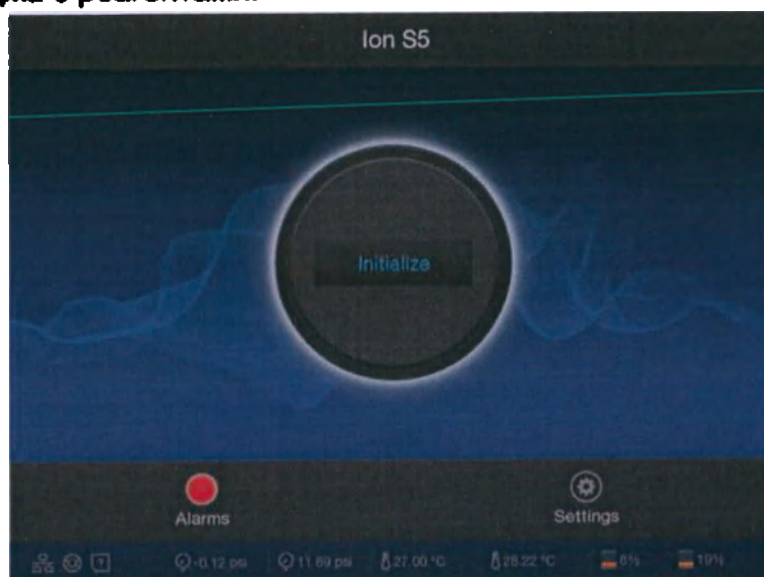
Когда необходима ручная очистка секвенатора.

Секвенаторы «F-Genetics Плюс» и «F-Genetics» нуждаются в очистке перед инициализацией. Данная очистка обычно осуществляется автоматически после завершения предыдущей процедуры секвенирования. Если проводятся две процедуры секвенирования, следует проводить очистку после второй процедуры секвенирования. Однако, если напротив поля «**Enable post-run clean**» (Очистка после секвенирования) снята галочка для того, чтобы провести второй цикл секвенирования, но при этом второй цикл не проводится, инициализация прибора не будет осуществляться до тех пор, пока не будет проведена ручная очистка. См. Дополнение Б. 2. Ручная очистка секвенатора «Ручная очистка секвенатора» на странице 134, чтобы получить дополнительную информацию о ручной очистке.

Если секвенаторы «F-Genetics Плюс» или «F-Genetics» выполнили инициализацию, и цикл секвенирования не проводится в течение 24 часов, или если цикл секвенирования не запускается в результате сбоя питания, не осуществляйте ручную очистку. Перед повторной инициализацией необходимо перезапустить прибор. См. «Дополнение Б. 3. Перезапуск прибора с инициализированным и неиспользованным картриджем с реагентами для секвенирования, для того чтобы получить дополнительную информацию.

8.5.3. Инициализация секвенатора

8.5.3.1. В главном меню на сенсорном экране секвенатора нажмите кнопку «Initialize» (Инициализировать). При этом открываются зажимы для дверцы, чипа и картриджа с реагентами.

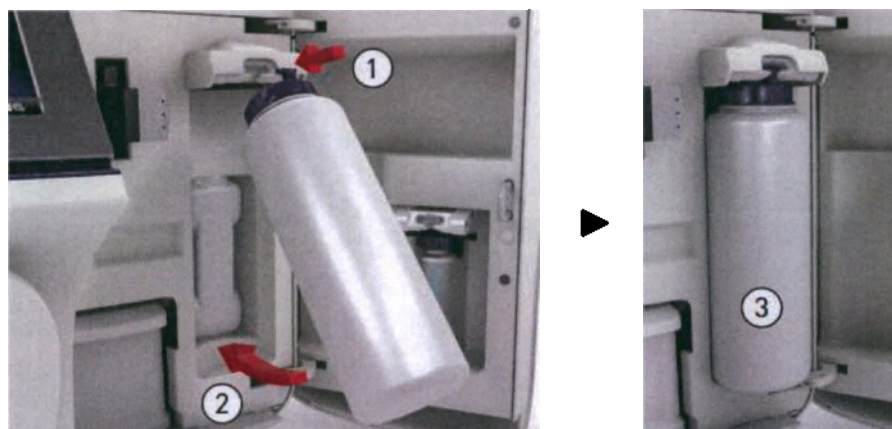


8.5.3.2. В случае появления соответствующего сообщения, снимите бутылку с промывочным раствором для того, чтобы получить доступ к емкости для отходов. Затем опустошите емкость для отходов.

8.5.3.3. Повторно установите пустую емкость для отходов.

8.5.3.4. Замените картридж с реагентами для секвенирования на новый картридж, который нагрет до комнатной температуры.

8.5.3.5. Убедитесь в том, что новая бутылка с промывочным раствором тщательно заболтана. Затем снимите колпачок и установите бутылку.



8.5.3.6. Убедитесь в том, что чип для секвенирования, использованный в предыдущем рабочем цикле, надлежащим образом закреплен в зажиме и вставлен до упора.

8.5.3.7. Если необходимо, установите новую бутылку с раствором для очистки.

Примечание: Бутылка с раствором для очистки содержит объем реагентов, достаточный для проведения 4 процедур очистки.

8.5.3.8. Закройте дверцу и нажмите кнопку «Next» (Далее).

Прибор подтверждает, что расходные материалы и чип надлежащим образом установлены, и раствор для очистки содержит достаточный объем реагентов для проведения очистки после процедуры секвенирования. Следуйте всем рекомендациям на экране для того, чтобы обеспечить надлежащую установку необходимых материалов.

ВНИМАНИЕ! После осуществления достаточного количества циклов очистки, на экране прибора может появиться сообщение, предупреждающее пользователя о необходимости заменить бутылку с раствором для очистки.

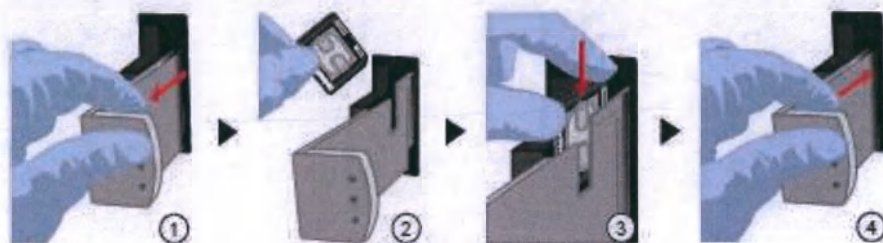
Примечание: См. Дополнение А. Поиск и устранение неисправностей. Результаты Ion Reporter, если на экране появляется сообщение «Проверка реагента: ошибка».

8.5.3.9. После завершения инициализации (приблизительно 50 минут), нажмите кнопку «Home» (Главный экран).

Теперь прибор готов для секвенирования.

8.5.4. Запуск процедуры секвенирования

Для того чтобы поместить чип в зажим необходимо:



- (1) Выдвинуть зажим для чипа
- (2) Вынуть чип, расположенный в зажиме во время инициализации
- (3) Поместить чип, загруженный в станции пробоподготовки, а зажим скошенным углом в нижний передний угол зажима

Примечание: Не применяйте силу, когда вставляете чип. Если чип не вставляется легко, убедитесь, что угол чипа ориентирован как показано на рисунке.

- (4) Задвинуть зажим до конца, затем закрыть дверцу прибора.

Мы рекомендуем секвенировать загруженные чипы с помощью секвенатора «**F-Genetics Плюс**» и «**F-Genetics**» сразу после завершения инициализации прибора. Однако, успешное секвенирование может осуществляться в течение 24 часов после инициализации прибора.

Примечание:

- Не нажимайте кнопку питания во время работы. Сбой питания прибора во время запуска может привести к прекращению секвенирования или потере образца.
- Мы рекомендуем проверить статус Запланированного запуска перед установкой загруженного чипа.

8.5.4.1. После завершения инициализации, нажмите кнопку **«Run» (Запуск)** на сенсорном экране прибора. Дверца и зажим для чипа открываются.

8.5.4.2. Достаньте использованный чип для секвенирования. Затем закрепите чип, загруженный станции пробоподготовки перед данным секвенированием, в зажим.

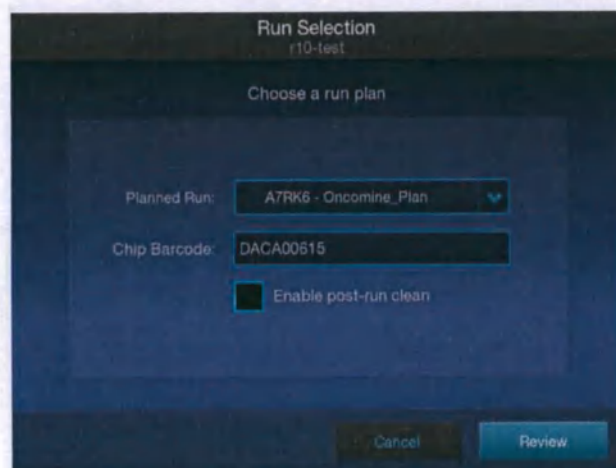
8.5.4.3. Задвиньте зажим, закройте дверцу и нажмите кнопку **«Next» (Далее)**.

Примечание: Не вынимайте чип из зажима до тех пор, пока не закончится запуск. Удаление и повторная установка чипа может привести к образованию воздушных пузырьков в чипе.

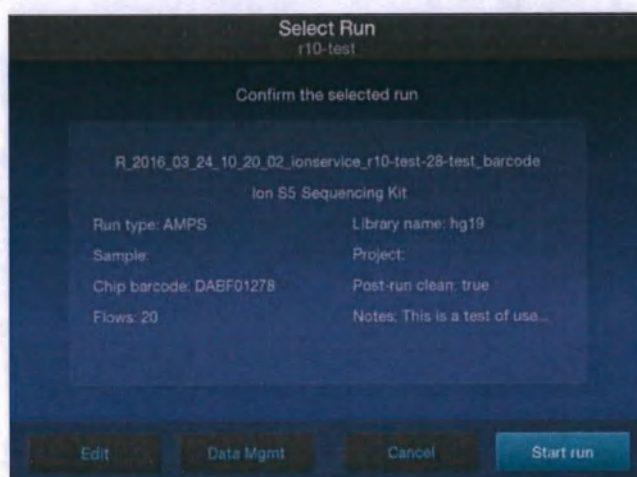
8.5.3.4. Убедитесь в том, что параметры Запланированного запуска заданы автоматически. При проведении первой процедуры секвенирования во время инициализации снимите галочку в поле **«Enable post-run clean» (Провести очистку после запуска)**, затем нажмите **Review (Просмотр)**.

ВНИМАНИЕ!

- Если галочка не снята в вышеуказанном поле, процедура очистки осуществляется автоматически после первого рабочего цикла. При этом второй цикл не проводится.
- Во время начала второго цикла секвенирования в рамках одной инициализации убедитесь в том, что напротив поля **«Enable post-run clean» (Провести очистку после запуска)** установлена галочка для того, чтобы система осуществляла очистку автоматически после секвенирования.



8.5.4.5. Убедитесь в том, что оставшиеся предварительно заданные настройки являются верными и, если необходимо, внесите изменения, используя кнопки и ниспадающие меню.



8.5.4.6. Убедитесь в том, что дверца прибора закрыта. Затем нажмите кнопку **«Start run» (Старт запуска)** для того, чтобы начать цикл секвенирования.

ВНИМАНИЕ! Во время рабочего цикла не открывайте дверцу и не прикасайтесь к ее поверхности. Прикосновение к прибору во время секвенирования может отрицательно сказаться на качестве измерения.

После завершения секвенирования прибор автоматически проводит процедуру очистки, если в поле **«Enable post-run clean» (Провести очистку после рабочего цикла)** стоит галочка. После очистки на сенсорном экране появляется главное меню.

В случае проведения секвенирования второго чипа в рамках одной инициализации начните второй цикл в течение 24 часов с момента начала инициализации.

8.5.5. Обслуживание секвенатора

Необходимые материалы

- Безворсовая ткань
- 70% изопропанол
- (Дополнительно) 10% раствор гипохлорита натрия

Очистка или дезинфекция секвенатора

В случае утечки или пролива жидкости внутрь прибора, выполните следующие действия.

Примечание: Все отходы должны утилизироваться в соответствующем контейнере для жидких или твердых отходов.

1. Снимите бутылку с раствором для очистки, затем снимите и опустошите емкость для отходов.
2. Снимите картридж с реагентами для секвенирования.
3. Проверьте емкости для отходов и реагентов на предмет наличия жидкости.
4. Используя абсорбирующую бумагу, соберите столько жидкости, сколько возможно. Затем промойте загрязненную зону 10% раствором гипохлорита натрия.
5. Промойте загрязнённые зоны 70% раствором изопропанола. Затем подождите, пока она не высохнет.

8.6. Очистка станции пробоподготовки

8.6.1. Информация о протоколе очистки

Станция пробоподготовки имеет функцию автоматической очистки, которая должна выполняться после каждого рабочего цикла. Процедура очистки запускается с сенсорного экрана станции пробоподготовки и сводит к минимуму риск загрязнения. Во время очистки станция облучает платформу ультрафиолетовым светом в течение 1 минуты после удаления всех расходных материалов из прибора.

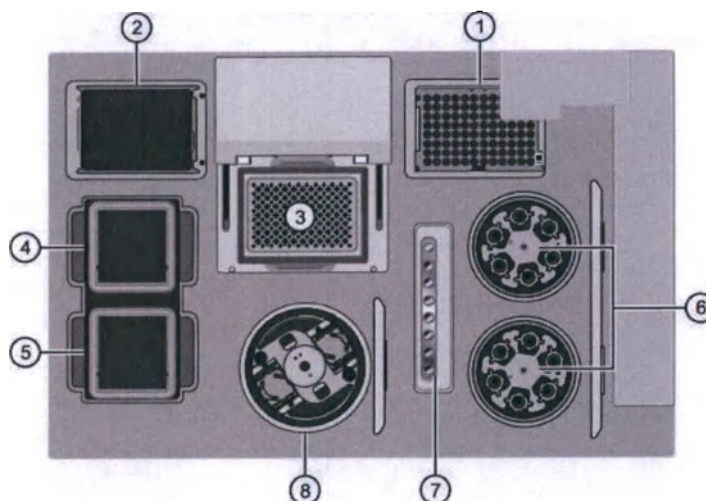
ВНИМАНИЕ! Несмотря на то, что процедура очистки станции пробоподготовки обеспечивает защиту от загрязнения, она не является надлежащей лабораторной практикой или достаточной мерой предосторожности. Во время подготовки библиотек ДНК к использованию или во время подготовки станции пробоподготовки, соблюдайте все методы стерильной работы в лабораторных условиях с целью обеспечения минимального загрязнения.

8.6.2. Необходимые материалы

- Неопудренные нитриловые перчатки
- 70% изопропиловый спирт
- Безворсовые салфетки

8.6.3. Очистка станции пробоподготовки

ВАЖНО! Очищайте станцию пробоподготовки как описано на страницах ниже после каждого рабочего цикла. Для того, чтобы предотвратить загрязнение, не используйте изделие без предварительной очистки.



Станция пробоподготовки:

- (1) Положение использованного наконечника
- (2) Пустой картридж: перемещение в станцию с использованными наконечниками
- (3) Блок образцов термоциклера
- (4) Станция для реагентов
- (5) Станция для растворов
- (6) Центрифуги для регенерации (извлечения образцов)
- (7) Станция для обогащения
- (8) Центрифуга для загрузки чипов

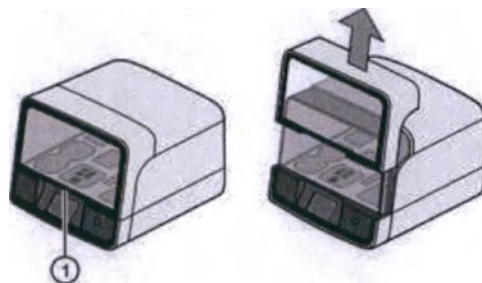
8.6.4. Удаление и утилизация использованных расходных материалов

ВАЖНО!

- Не выбрасывайте пустой картридж с наконечниками.
- Перенесите образцы контроля качества, прежде чем снять и выбросить картридж с реагентами.

8.6.4.1. Нажмите кнопку  (открыть дверцу) на сенсорном экране прибора. Подождите пока защелка не откроется.

8.6.4.2. Поднимите дверцу прибора вверх до тех пор, пока не сработает механизм блокировки.

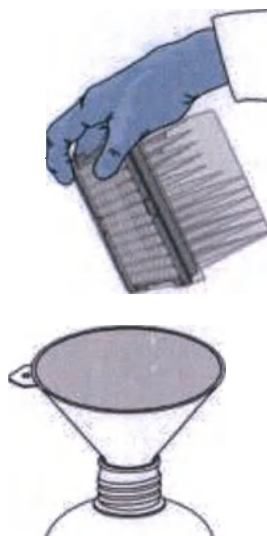


(1) Нажмите здесь, затем поднимите.

8.6.4.3. Снимите планшет 96-луночный с блока для образцов термоциклера.

8.6.4.4. Снимите блок с использованными наконечниками с позиции для пустых наконечников.

ВАЖНО! Аккуратно обращайтесь с одноразовой емкостью, расположенной в позиции для пустых наконечников. Во время рабочего цикла в резервуаре собираются жидкие отходы. Удалите жидкие отходы, слегка наклонив ёмкость и выливая отходы в соответствующий резервуар для сбора отходов:



ВАЖНО! Не используйте штатив с использованными наконечниками повторно. Всегда перемещайте пустой картридж с наконечниками с позиции для новых наконечников в позицию для пустых наконечников.

8.6.4.5. Переместите картридж с пустыми наконечниками в позицию для пустых наконечников.

8.6.4.6. Снимите и удалите

- Картридж с реагентами
- Картридж с растворами
- Штатив с пробирками для модуля обогащения

8.6.4.7. Снимите, а затем удалите материалы с центрифуг для регенерации (извлечения образцов), включая:

- Крышки для центрифуг
- Пробирки

8.6.4.8. Снимите противовес для чипов с центрифуги для загрузки чипов. Не удаляйте его.

8.6.4.9. Закройте крышку центрифуги для загрузки чипов.

8.6.5. Проверка и очистка центрифуг для регенерации (извлечения образцов) и люлек

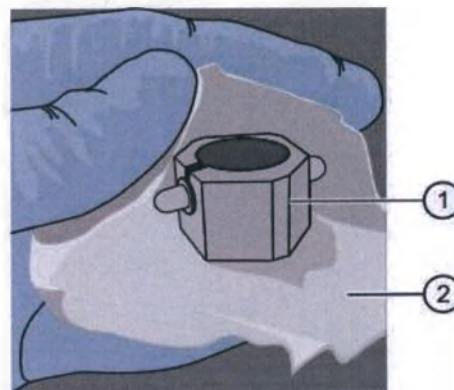
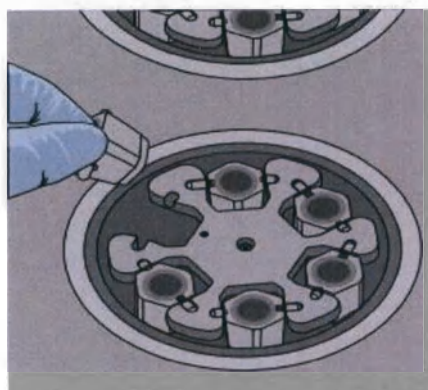
8.6.5.1. Проверьте центрифуги для регенерации (извлечения образцов). Затем очистите компоненты в случае наличия избыточного количества жидкости.

Таблица 24

Присутствует ли жидкость?	Действия
Нет	Перейдите к разделу 8.6.6. «Начало процедуры очистки»
Да	Очистите ротор и люльки нижеописанным способом. ВАЖНО! Очищайте центрифуги, только если в роторе и/или люльках заметно избыточное количество жидкости. Вы не должны очищать центрифугу после каждого рабочего цикла.

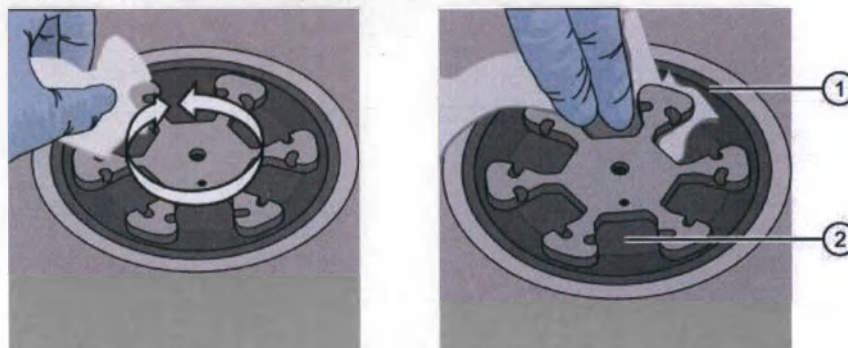
ВАЖНО! Надевайте неопудренные нитриловые перчатки во время очистки центрифуги для регенерации (извлечения образцов).

8.6.5.2. Выньте адаптеры из центрифуг для регенерации (извлечения образцов). Очистите внешние и внутренние поверхности каждого адаптера, используя безворсовую салфетку. Затем разместите адаптеры на чистой и сухой поверхности во время очистки самой центрифуги.



- (1) Адаптер
(2) Безворсовая салфетка

8.6.5.3. Используйте безворсовую салфетку для того, чтобы собрать всю жидкость с внутренней части ротора центрифуги.



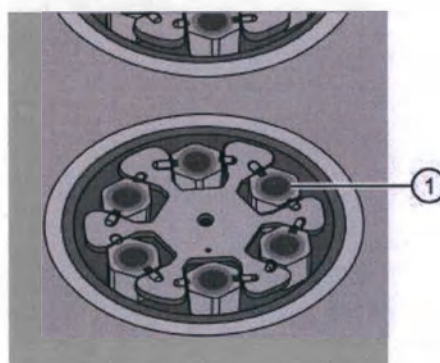
- (1) Внутренний обод центрифуги
(2) Дно ротора центрифуги

8.6.5.4. Используйте безворсовые салфетки, смоченные в 70% изопропаноле, для того, чтобы очистить:

- Внутренний обод центрифуги
- Дно ротора центрифуги
- Внутреннюю и внешнюю поверхность роторов центрифуги.

8.6.5.5. Протрите центрифугу и адаптеры безворсовой салфеткой.

8.6.5.6. Установите адаптеры центрифуги. Затем закройте крышку центрифуги для регенерации (извлечения образцов).



Адаптеры (очищенные и установленные)

8.6.6. Начало процедуры очистки

8.6.6.1. Закройте дверцу прибора, сначала слегка подняв ее для разблокировки, а затем опустите вниз до тех пор, пока замок не заблокируется.

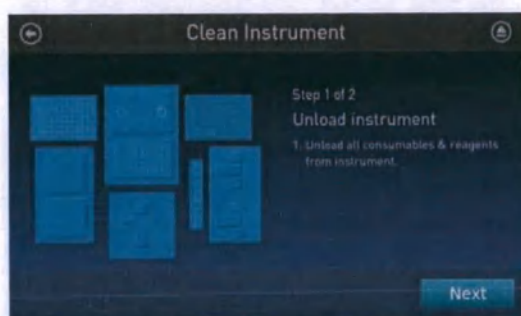
ВНИМАНИЕ! Перед закрытием дверцы, убедитесь в том, что крышки центрифуги для регенерации (извлечения образцов) и центрифуги для загрузки чипов закрыты.

8.6.6.2. Для того, чтобы начать процедуру очистки, нажмите кнопку «Next» (Далее) на сенсорном экране станции для пробоподготовки, который загорается после завершения рабочего цикла.



Примечание: Вы также можете очищать прибор в любое время, выбрав соответствующую опцию на главном экране. Нажмите **Settings** ▶ **Clean Ion Chef** (**Настройки** ▶ **Очистка станции пробоподготовки**).

8.6.6.3. Убедитесь в том, что вы удалили все расходные материалы из станции для пробоподготовки, кроме пустого штатива для наконечников, который находится в позиции для пустых наконечников. Затем нажмите кнопку «Next» (Далее).



8.6.6.4. Если дверца закрыта, нажмите кнопку «Start» (Старт). Прибор начнет процедуру сканирования платформы перед началом процедуры очистки. Станция для пробоподготовки прекращает вентилирование и облучает ультрафиолетовым светом (УФ) в течение 1 минуты.



ВНИМАНИЕ! Станция для пробоподготовки излучает ультрафиолетовый свет длиной в 254 нм. Необходимо надевать защитные очки, одежду и перчатки во время работы с прибором. Не смотрите на ультрафиолетовый свет во время процедуры очистки прибора.

8.7. Анализ результатов секвенирования

8.7.1. Протоколы анализа в программном обеспечении Ion Reporter

Если запланированные запуски были правильно настроены в программном обеспечении системы «F-Genetics» «Torrent Suite», то автоматический анализ уже был выполнен, и вы можете просмотреть результаты анализа набора «ОнкоФокус» в программном обеспечении «Ion Reporter». Инструкции по запуску анализа вручную см. в разделе 8.7.2. «Запуск анализа вручную».

Примечание. Для просмотра файлов .vcf, .csv и .tsv требуется Microsoft Excel или другой инструмент для работы с электронными таблицами.

Протоколы, доступные в программном обеспечении Ion Reporter включают:

Протокол анализа	Описание
Протоколы Ion Reporter Software версии 5.10	
Oncomine Focus - 520 - w2.4 - DNA and Fusions - Single Sample (Oncomine Focus - 520 - w2.4 - ДНК и химерные транскрипты – в одном образце)	Обнаруживает и аннотирует соматические варианты с низкой аллельной частотой (SNV, InDels, CNV) из таргетных библиотек ДНК, а также слитные гены из таргетных РНК-библиотек
Oncomine Focus - 520 - w2.4 - DNA - Single Sample (Oncomine Focus - 520 - w2.4 - ДНК – в одном образце)	Обнаруживает и аннотирует соматические варианты с низкой аллельной частотой (SNV, InDels, CNV) из таргетных библиотек ДНК
Oncomine Focus - 520 - w2.4 - Fusions - Single Sample (Oncomine Focus - 520 - w2.4 - Химерные транскрипты – в одном образце)	Обнаруживает и аннотирует слияние генов из таргетных РНК-библиотек
Oncomine Focus - 520 - w2.4 - Annotate Variants - Single Sample (Oncomine Focus - 520 - w2.4 – Аннотирование вариантов – в одном образце)	Аннотирует VCF-файлы

8.7.2. Запуск анализа вручную

8.7.2.1. Войдите в программное обеспечение «Ion Reporter».

8.7.2.2. Во вкладке **Workflows** (Протоколы) в разделе **Overview** (Обзор) выберите **DNA and Fusions** (ДНК и химерные транскрипты) из выпадающего списка **Research Application** (исследовательские приложения).

8.7.2.3. Введите **Focus** в поле поиска и нажмите **Go** (Перейти) (или нажмите клавишу **Enter** (Ввод)).

8.7.2.4. В столбце **Workflow Name** (Название протокола) выберите соответствующий протокол (например, Oncomine Focus - 520 - w2.4 - DNA and Fusions - Single Sample), затем нажмите **⚙ Actions** (Действия) ► **Launch Analysis** (Запуск анализа) в панели **Details** (Сведения)

8.7.2.5. На этапе **Samples** (Образцы) выполните поиск по любому уникальному идентификатору, который вы использовали для обозначения образца, затем

убедитесь, что для образца установлены **Cellularity%** (объём клеточного содержимого) и **Sample Type** (Тип образца).

8.7.2.6. Установите флажок, чтобы выбрать **DNA and Fusions** (ДНК и химерные транскрипты).

8.7.2.7. На панели **Sample Groups** (Группы образцов) нажмите **Add Samples** (Добавить образцы), чтобы добавить выбранные образцы в группу.

8.7.2.8. Введите **Group Name** (Имя группы), нажмите **Add to Analysis** (Добавить в анализ), затем нажмите **Next** (Далее).

8.7.2.9. На этапе **Plugins** (Подключаемые модули) убедитесь, что выбран подключаемый модуль **Oncomine Variant Annotator v2.4**, затем нажмите **Next** (Далее).

8.7.2.10. (Дополнительно) Введите **Analysis Name** (Название анализа) и **Description** (Описание), затем нажмите **Launch Analysis** (Запустить анализ).

Analysis ready to launch!

Review the selected options, name your analysis and then launch it.

Analysis Name:

Description:

8.7.3. Просмотр результатов

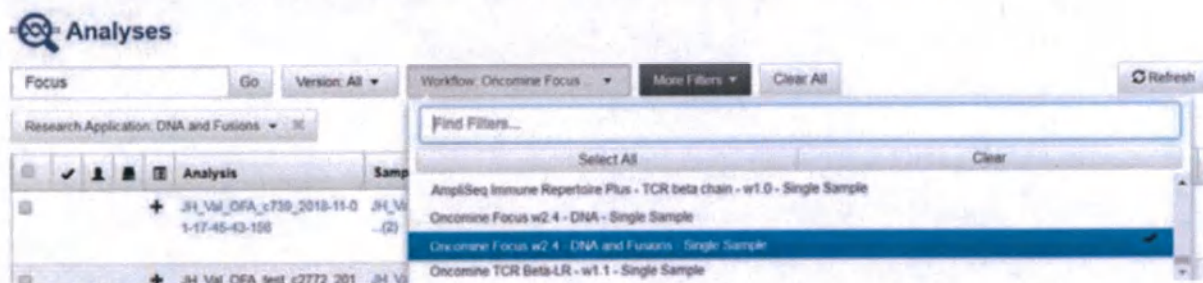
Анализ с помощью программного обеспечения «Ion Reporter» выполняется автоматически при загрузке данных из программного обеспечения «Torrent Suite».

8.7.3.1. Войдите в программное обеспечение «Ion Reporter».

8.7.3.2. Откройте вкладку **Analyses** (Анализы).

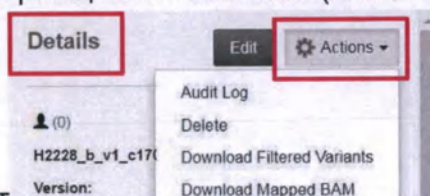
Меню **Overview** (Обзор) отображает список анализов на вкладке **Analyses** (Анализы).

8.7.3.3. В выпадающем списке **Workflow** (Протокол) выберите **Oncomine Focus - 520 - w2.4 - DNA and Fusions - Single Sample**, чтобы ограничить список результатов, анализируемых с использованием этого протокола.



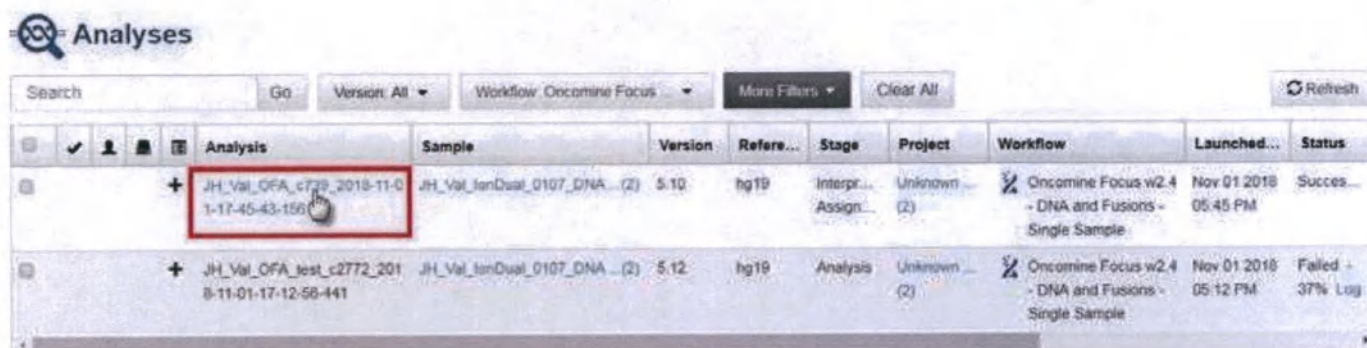
Вы можете дополнительно оптимизировать список анализов, применив **More Filters** (Дополнительные фильтры) или кликнув заголовки столбцов. Таблица **Analyses** автоматически фильтрует содержимое, соответствующее вашему выбору.

8.7.3.4. Щелкните внутри строки (но не на гиперссылке с данными образца), чтобы просмотреть подробную информацию об анализе (**Details**).



В области **Details** вы можете просмотреть протокол и получить доступ к выпадающему списку **Actions** (Действия).

8.7.3.5. Щелкните на гиперссылке с результатом образца в столбце **Analysis** (Анализ), чтобы открыть страницу **Analysis Results** (Результаты анализа).



б. Откроется страница **Analysis Results** (Результаты анализа) с вкладкой **Oncomine**, в которой отображаются только аннотированные варианты, которые являются известной причиной возникновения рака.

Summary Oncomine Fusions Functional Population Ontologies Pharmacogenomics QC					
...	Locus	Oncomine Variant Class	Oncomine Gene Class	Genes	
☐	chr12:25364760	Amplification	Gain-of-function	KRAS	
☐	chr17:37868125	Amplification	Gain-of-function	ERBB2	
☐	chr7:55198955	Amplification	Gain-of-function	EGFR	
☐	chr2:42492091 - chr2:29446394	Fusion	Gain-of-function	EML4(6) - ALK(20)	
☐	chr2:42491871 - chr2:29446394	Fusion	Gain-of-function	EML4(6) - ALK(20)	
☐	chr10:61655879 - chr10:43612031	Fusion	Gain-of-function	CCDC8(1) - RET(12)	

8.7.3.6. В таблице результатов анализа **Analysis Results** отсортируйте или отфильтруйте данные с помощью аннотаций, специфичных для набора «ОнкоФокус».

а. На панели **Filter Options** (Параметры фильтра) выберите нужную группу фильтров.

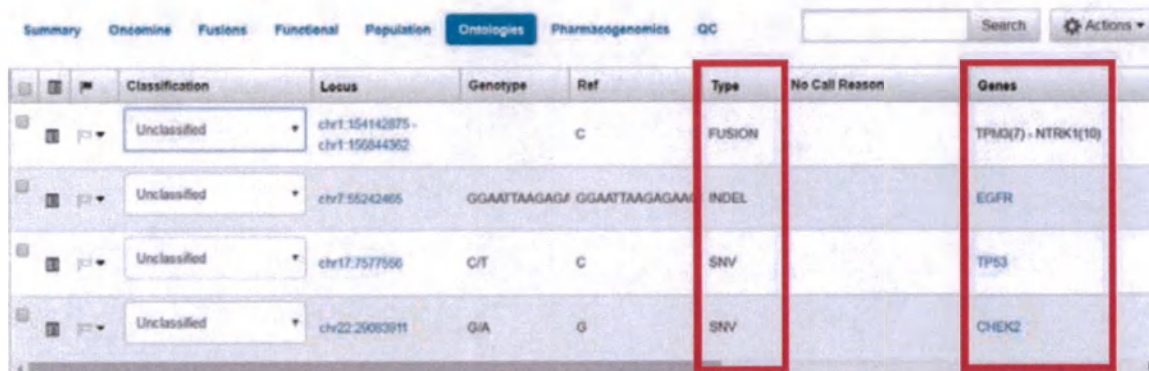
Примечание: Группой фильтров по умолчанию является **Oncomine Variants, 5% CI CNV ploidy $\geq$ gain of 2 over normal (5.10)**, что ограничивает отображаемые результаты только драйверными вариантами рака. Каждый выявленный вариант

должен удовлетворять всем условиям группы фильтров, чтобы быть включенной в результат.

Выберите **No Filter** (Без фильтра), чтобы просмотреть все потенциально выявленные варианты.

б. На вкладке **Oncomine** щелкните на заголовки столбцов, чтобы отсортировать список вариантов по вариантам **Oncomine Variant Class** или генам **Oncomine Gene Class**.

в. Во вкладке **Ontologies** (Онтологии) щелкните на заголовки столбцов, чтобы отсортировать список по типам вариантов (**Type**) или генов (**Genes**).



Classification	Locus	Genotype	Ref	Type	No Call Reason	Genes
Unclassified	chr1:154142875 - chr1:155844352		C	FUSION		TPM3(7) - NTRK1(10)
Unclassified	chr7:55242465	GGAATTAAGAG/ GGAATTAAGAGAA		INDEL		EGFR
Unclassified	chr17:7577556	C/T	C	SNV		TP53
Unclassified	chr22:20083911	G/A	G	SNV		CHEK2

После того как вы просмотрели, отфильтровали и отсортировали результаты анализа (**Analysis Results**), вы можете создать отчет (см. раздел 8.7.4. «Создание отчета о результатах анализа»).

8.7.4. Создание отчета о результатах анализа

После того как вы просмотрели, отфильтровали и отсортировали результаты анализа, вы можете скачать отчет об анализе. Описанная процедура включает в себя создание и форматирование шаблона отчета.

8.7.4.1. На экране **Analysis Results** (Результаты анализа) для вашего образца нажмите **Generate Report** (Создать отчет).

Рабочая панель **Generate Report** откроется на этапе настройки **Configuration** (Конфигурация). Разделы отчета могут быть переставлены, удалены или отредактированы.

8.7.4.2. Введите информацию в редактируемые поля (например, отредактируйте название отчета или введите базовую информацию).

8.7.4.3. (Опционально) Нажмите **Save As New Template** (Сохранить как новый шаблон), чтобы сохранить перенастроенный шаблон отчета для будущего использования для других образцов.

8.7.4.4. Нажмите **Next** (Далее), появится предварительный просмотр вашего отчета.

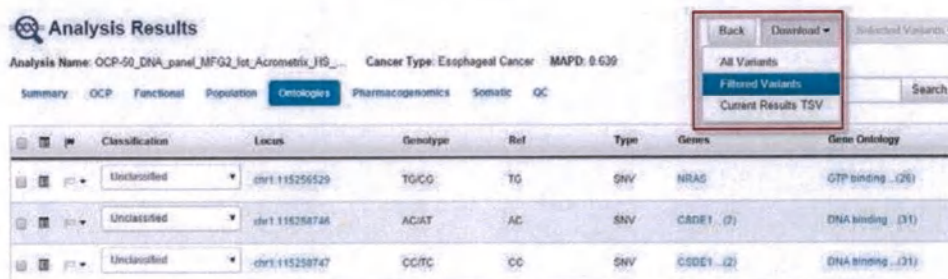
8.7.4.5. Нажмите **Lock & Publish** (Зафиксировать и опубликовать), чтобы создать окончательный отчет по анализу.

8.7.4.6. Нажмите **Download** (Скачать).

8.7.5. Скачивание аннотированных с помощью Ion Reporter файлов VCF или TSV

Файлы формата определенных вариантов (Variant call format, VCF) и разделенных табуляцией значений (tab separated values, TSV) для полного списка или для отфильтрованных результатов можно скачать с экрана **Analysis Results**.

8.7.5.1. Нажмите **Download** (Скачать), затем выберите **All Variants** (Все варианты), **Filtered Variants** (Отфильтрованные варианты) или **Current Results TSV** (Текущие результаты TSV).



8.7.5.2. Нажмите **Home►Notifications** (Домашняя страница►Уведомления) чтобы открыть экран уведомлений, затем нажмите **⬇** рядом с названием файла, чтобы скачать результаты.

Или выберите одну или несколько строк, затем нажмите **Download** (Скачать).

Программное обеспечение генерирует ZIP-файл с 4 папками: CNV_VCIB, QC, Variants и Workflow_Settings. В папке Variants вы найдете аннотированный VCF-файл.

Папка	Содержание папки
CNV_VCIB	Содержит файл-изображение (cn_results.png) определения количества копий для всех ампликонов.
QC	Содержит PDF-отчет о контроле качества и папку, содержащую файлы со статистикой покрытия.
Variants	Содержит папку с: • Промежуточными и аннотированными VCF файлами. • Файлами TSV, содержащими как отфильтрованные, так и все соматические варианты.
Workflow_Settings	Содержит папки с: • Текстовым файлом, описывающим настройки, используемые для анализа. Откройте файл в текстовом редакторе. • Файлы конфигурации, используемые программным обеспечением Ion Reporter в настройках протокола.

Низкая однородность ампликонов (только для ДНК)

Наблюдение	Возможная причина	Рекомендуемые действия
Короткие ампликоны представлены недостаточно	Проблемы при очистке библиотек	Тщательно вортируйте реагент для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agencourt AMPure XP») перед использованием и убедитесь, что набираете полный объем
		100%-ный этанол трудно отобрать аккуратно – важно предварительно смочить наконечники для пипеток
		При очистке библиотеки после лигирования увеличьте объем реагента для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agencourt AMPure XP») с 45 мкл (1,5X) до 50 мкл (1,7X)

Таблица A2

Получение и количественная оценка библиотеки

Наблюдение	Возможная причина	Рекомендуемые действия
Низкая концентрация библиотеки (концентрация библиотеки НЕ указывает на ее качество)	Образец ДНК или РНК был неправильно измерен	Перемеряйте концентрацию ДНК/РНК в образце
	Остаточный этанол в образце ДНК или РНК ингибировал таргетную амплификацию	Держите в ламинаре пробирку с открытой крышкой в течение часа
		Высушите пробирку с помощью вакуумной центрифуги при комнатной температуре в течение 5 минут
	Остаточный этанол после очистки реагентом для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agencourt AMPure XP») ингибировал амплификацию библиотеки	Осторожно удалите все капли этанола перед амплификацией библиотеки, затем центрифугируйте планшет, если необходимо
	Качество образца ДНК или РНК было низким	Добавьте ДНК/РНК или увеличьте количество

		циклов при таргетной амплификации
	ПЦР, расщепление или лигирование прошли плохо	Обеспечьте правильное пипетирование и смешивание вязких компонентов на каждом этапе
	Магнитные частицы реагента для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agencourt AMPure XP») были пересушены	Не муштите магнитные частицы более 5 минут
	Реагент для очистки продуктов ПЦР на магнитных частицах («Agencourt AMPure XP») ингибировал амплификацию библиотеки	Перенесите библиотеки, свободные от частиц, перед амплификацией
	Время цикла qPCR недостаточно	Используйте стандартные циклы qPCR для библиотеки длинее 175 п.о., а не программу быстрой амплификации
Слишком высокая концентрация библиотеки	Образец ДНК или РНК был неправильно измерен	Перемеряйте концентрацию ДНК/РНК в образце
	Использовали более 100 нг образца ДНК/РНК	Добавьте меньше ДНК/РНК или уменьшите количество циклов при таргетной амплификации

Таблица А3

Другое

Наблюдение	Возможная причина	Рекомендуемые действия
Количество целевых прочтений (on-target reads) меньше ожидаемого	Неизвестна	Увеличьте количество циклов таргетной амплификации на 2
Распределение баркодов неравномерно	Количественная оценка библиотеки была неточной	Используйте набор 1.5./2.4. Набор для измерения концентрации библиотек для наиболее точного и специфичного определения библиотеки
	Пулирование библиотеки было неточным	Развести библиотеки до 50 пМ, затем объедините равные объемы
Процент поликлональных ISPs высок (>40%)	Количество библиотеки слишком высоко	Уменьшите на 50% количество библиотеки, используемое на этапе подготовки матрицы

	Концентрация библиотеки была определена неправильно	Убедитесь, что концентрация библиотеки измерена верно
Процент поликлональных ISPs низкого качества высок (>15%)	Количество библиотеки слишком низко	Удвойте объем библиотеки, используемой при подготовке матрицы
		Используйте свежеприготовленные разведения библиотеки в низкоадгезивной пробирке

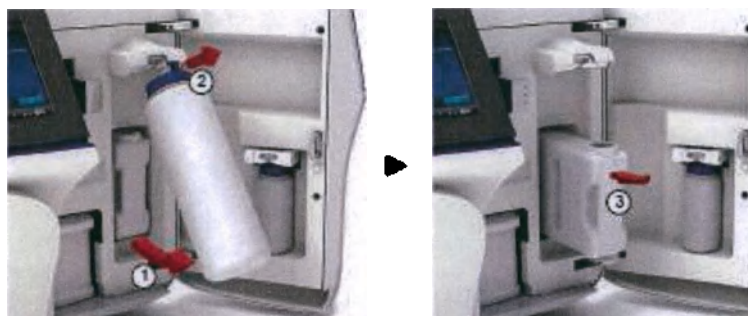
ДОПОЛНЕНИЕ Б Дополнительные процедуры

1. Ручная очистка секвенатора

Протокол очистки обычно осуществляется автоматически после завершения каждого цикла секвенирования. Если очистка необходима, повторите следующие шаги:

1.1. В главном окне выберите опцию **Settings** ▶ **Clean Instrument** (Настройка ▶ Очистка прибора). Дверца прибора открывается, обеспечивая доступ к расходным материалам.

1.2. Достаньте бутылку с промывочным раствором для того, чтобы получить доступ к емкости для отходов. Затем снимите и слейте использованную жидкость с емкости.



1.3. Повторно установите пустой резервуар для отходов и использованную бутылку с промывочным раствором.

1.4. Убедитесь в том, что картридж с реагентами для секвенирования и бутылку с промывочным раствором установлены правильно.

ВАЖНО! Проведите очистку с использованным картриджем с реагентами и установленной бутылкой с промывочным раствором. При очистке, раствор для очистки попадает в бутылку с промывочным раствором и картридж с реагентами, что делает их непригодными для секвенирования.

1.5. Установите использованный чип для секвенирования в специальный зажим и задвиньте его до упора.

1.6. Закройте дверцу прибора и нажмите кнопку «Next» (Далее).

Цикл очистки занимает приблизительно 35 минут. После очистки дверца прибора открывается, и зажимы для чипа и картриджа выходят из зацепления.

1.7. Перейдите к разделу 8.5 «Инициализация секвенатора».

2. Перезапуск прибора с инициализированным и неиспользованным картриджем с реагентами для секвенирования

Очистка обычно проводится автоматически после завершения цикла секвенирования. Если секвенатор F-Genetics и F-Genetics Плюс инициализируется и

- цикл секвенирования не проводится в течение 24 часов после инициализации или

- секвенирование не завершается из-за сбоя питания или прерывания процесса и перед остановкой число циклов < 200.

Необходимо перезапустить устройство для того, чтобы обеспечить правильную очистку перед повторной инициализацией. Не проводите ручную

очистку с неиспользованным и инициализированным картриджем с реагентами для секвенирования.

Примечание:

• В случае сбоя питания или остановки работы во время второго рабочего цикла после однократной инициализации, достаточно провести ручную очистку (страница 134).

• Если количество циклов перед сбоем питания или прерыванием работы неизвестно, перезапустите прибор.

Для того, чтобы перезапустить прибор, осуществите нижеописанную процедуру перед повторной инициализацией:

2.1. В главном меню на сенсорном экране прибора нажмите кнопку «Run» (Запуск).

Дверца прибора разблокируется, и защелка зажима для чипа выйдет открытой.

2.2. Убедитесь в том, что использованный чип для секвенирования находится в зажиме. Затем полностью задвиньте зажим для чипа.

2.3. Закройте дверцу прибора и нажмите кнопку «Next» (Далее).

2.4. Если на экране появится соответствующая инструкция, выберите опцию «Planned Run (none)» (Запланированный запуск (нет)).

2.5. В окне «Select Run» (Выбрать Запуск) нажмите кнопку «Edit» (Изменить). В окне «Detail» (Подробная информация) установите число циклов на 200. Убедитесь в том, что поле «Post-Run/Clean» (Очистка после рабочего цикла) отмечено галочкой, затем нажмите кнопку «Close» (Заккрыть).

2.6. Нажмите кнопку «Start run» (Запуск рабочего цикла). Затем нажмите кнопку «Accept» (Принять) чтобы подтвердить активацию процедуры очистки после рабочего цикла и начать рабочий цикл.

После завершения процедуры перезапуска прибора, последний автоматически выполнит процедуру очистки. После очистки на сенсорном экране появится главное окно.

ДОПОЛНЕНИЕ В Создание аккаунта Ion Reporter

1. Зарегистрируйтесь в ПО системы Torrent Suite.
2. Нажмите  **Settings (Настройки)** в верхнем правом углу, затем выберите **Ion Reporter Configure**.
3. На экране **Ion Reporter Uploader Account Configuration** нажмите **+ Add Account ► Ion Reporter**.
4. На экране **Add Ion Reporter Account** введите следующую информацию в соответствующие поля:

Поле	Действия
Server Type (Тип сервера)	Выберите ^[1]
Display Name (Наименование дисплея)	Используйте информативное наименование, это наименование используется при планировании запуска и видно другим пользователям.
Server (Сервер)	Введите ^[1]
Port (Порт)	Введите: 443
User Name (Имя пользователя)	Введите наименование пользователя (ваш e-mail)
Password (Пароль)	Введите ваш пароль

^[1] Уточните данную информацию у представителя производителя.

5. «Аккаунт по умолчанию» - это аккаунт, который создается по умолчанию в шаблоне запуска или плане запуска. Если этот аккаунт основной поставьте флажок на **Default Account** (вы можете изменить этот выбор при создании шаблона Запланированного запуска).
6. Нажмите **Get Versions (Выберите версию)**, выберите **Ion Reporter 5.2 or later**, затем нажмите  **Add**.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температурах, указанных в таблице ниже, всеми видами крытых транспортных средств, компоненты набора №№ 1.1.5, 1.1.7, 1.1.8, 1.1.11, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.9, 1.11, 2.1.5, 2.1.7, 2.1.8, 2.1.11, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3.2, 2.4, 2.8, 2.10 транспортировать в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах:

Время транспортирования не ограничено при условии соблюдения температурного режима. Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

Таблица 24

№№	Компонент набора	Условия транспортирования
1.	«ОнкоФокус 64»	
1.1.	Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт»:	
1.1.1.	Лизирующий буфер	от +15 до + 30°C
1.1.2.	Изолирующий реагент	
1.1.3.	Отмывочный концентрат 1	
1.1.4.	Отмывочный концентрат 2/3	
1.1.5.	Протеаза	от -25 до -15°C
1.1.6.	Раствор для элюции	от +15 до + 30°C
1.1.7.	ДНКаза	от -25 до -15°C
1.1.8.	Буфер для ДНКаз, 10X	
1.1.9.	Фильтрующие картриджи	от +15 до + 30°C
1.1.10.	Собирающие пробирки	
1.1.11.	РНКаза А	от -25 до -15°C
1.2.	Набор реагентов для обратной транскрипции:	от -25 до -15°C
1.3.	Набор «ОФ» для ручного создания библиотек:	от -25 до -15°C
1.4.	Набор баркодов 1-16	от -25 до -15°C
1.5.	Набор для измерения концентрации библиотек	от -25 до -15°C
1.6.	Набор полупроводниковых чипов 520	от +15 до + 30°C
1.7.	Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки	от +15 до + 30°C
1.8.	Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки	
1.9.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	от -25 до -15°C
1.10.	Набор растворов «ОФ» для секвенирования	от +15 до + 30°C
1.11.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования	от -25 до -15°C
2.	«ОнкоФокус 32 авто»	
2.1.	Набор для выделения тотальной ДНК/РНК	
2.1.1.	Лизирующий буфер	от +15 до + 30°C
2.1.2.	Изолирующий реагент	
2.1.3.	Отмывочный концентрат 1	
2.1.4.	Отмывочный концентрат 2/3	
2.1.5.	Протеаза	от -25 до -15°C
2.1.6.	Раствор для элюции	от +15 до + 30°C
2.1.7.	ДНКаза	от -25 до -15°C

№№	Компонент набора	Условия транспортирования
2.1.8.	Буфер для ДНКаз, 10X	от +15 до + 30°C
2.1.9.	Фильтрующие картриджи	
2.1.10.	Собирающие пробирки	
2.1.11.	РНКаза А	от -25 до -15°C
2.2.	Набор реагентов для обратной транскрипции	от -25 до -15°C
2.3.	Набор «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек	от -25 до -15°C
2.3.1.	Панель «ОФ-авто» для создания ДНК-библиотек, 2X	
2.3.2.	Панель «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X	
2.3.3.	Набор реагентов «ОФ-авто» для подготовки библиотек	от +15 до + 30°C
2.3.3.1.	Картридж «ОФ-авто» с растворами для станции пробоподготовки	
2.3.3.2.	Картридж «ОФ-авто» с реагентами для станции пробоподготовки	
2.3.3.3.	Набор материалов «ОФ-авто» для станции пробоподготовки	
2.3.3.4.	Набор баркодов «ОФ-авто» 1-32	от -25 до -15°C
2.4.	Набор для измерения концентрации библиотек	
2.5.	Набор полупроводниковых чипов 520	от +15 до + 30°C
2.6.	Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки	от +15 до + 30°C
2.7.	Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки	
2.8.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	от -25 до -15°C
2.9.	Набор растворов «ОФ» для секвенирования	от +15 до + 30°C
2.10.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования	от -25 до -15°C
* Допускается транспортирование при температуре окружающей среды		

9.3. Хранение

Набор хранить при температурах, указанных в таблице ниже в течение всего срока годности набора.

Таблица 25

№№	Компонент набора	Условия хранения
1.	«ОнкоФокус 64»	
1.1.	Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт»:	от +15 до + 30°C
1.1.1.	Лизирующий буфер	
1.1.2.	Изолирующий реагент	
1.1.3.	Отмывочный концентрат 1	
1.1.4.	Отмывочный концентрат 2/3	
1.1.5.	Протеаза	от -25 до -15°C
1.1.6.	Раствор для элюции	от +15 до + 30°C
1.1.7.	ДНКаз	от -25 до -15°C
1.1.8.	Буфер для ДНКаз, 10X	
1.1.9.	Фильтрующие картриджи	от +15 до + 30°C
1.1.10.	Собирающие пробирки	
1.1.11.	РНКаза А	от -25 до -15°C
1.2.	Набор реагентов для обратной транскрипции:	от -25 до -15°C
1.3.	Набор «ОФ» для ручного создания библиотек:	от -25 до -15°C
1.4.	Набор баркодов 1-16	от -25 до -15°C
1.5.	Набор для измерения концентрации библиотек	от -25 до -15°C
1.6.	Набор полупроводниковых чипов 520	от +15 до + 30°C
1.7.	Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки	от +15 до + 30°C
1.8.	Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки	
1.9.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	от -25 до -15°C

№№	Компонент набора	Условия хранения
1.10.	Набор растворов «ОФ» для секвенирования	от +15 до + 30°C
1.11.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования	от -25 до -15°C
2.	«ОнкоФокус 32 авто»	
2.1.	Набор для выделения тотальной ДНК/РНК	
2.1.1.	Лизирующий буфер	от +15 до + 30°C
2.1.2.	Изолирующий реагент	
2.1.3.	Отмывочный концентрат 1	
2.1.4.	Отмывочный концентрат 2/3	
2.1.5.	Протеаза	от -25 до -15°C
2.1.6.	Раствор для элюции	от +15 до + 30°C
2.1.7.	ДНКаза	от -25 до -15°C
2.1.8.	Буфер для ДНКаз, 10X	
2.1.9.	Фильтрующие картриджи	от +15 до + 30°C
2.1.10.	Собирающие пробирки	
2.1.11.	РНКаза А	от -25 до -15°C
2.2.	Набор реагентов для обратной транскрипции	от -25 до -15°C
2.3.	Набор «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек	
2.3.1.	Панель «ОФ-авто» для создания ДНК-библиотек, 2X	от -25 до -15°C
2.3.2.	Панель «ОФ-авто» для создания РНК-библиотек, 2X	
2.3.3.	Набор реагентов «ОФ-авто» для подготовки библиотек	
2.3.3.1.	Картридж «ОФ-авто» с растворами для станции пробоподготовки	от +2 до + 8°C
2.3.3.2.	Картридж «ОФ-авто» с реагентами для станции пробоподготовки	от -25 до -15°C
2.3.3.3.	Набор материалов «ОФ-авто» для станции пробоподготовки	от +15 до + 30°C
2.3.3.4.	Набор баркодов «ОФ-авто» 1-32	
2.4.	Набор для измерения концентрации библиотек	от -25 до -15°C
2.5.	Набор полупроводниковых чипов 520	от +15 до + 30°C
2.6.	Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки	от +15 до + 30°C
2.7.	Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки	
2.8.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки	от -25 до -15°C
2.9.	Набор растворов «ОФ» для секвенирования	от +15 до + 30°C
2.10.	Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования	от -25 до -15°C

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

10. МАРКИРОВКА

Маркировка внутренней (индивидуальной) упаковки компонентов набора реагентов должна содержать:

- наименование производителя;
- сокращенное наименование набора реагентов;
- наименование компонента;
- объем/количество компонента;
- номер по каталогу;
- номер серии;
- срок годности;
- условия хранения;

- символ «Медицинское изделие для диагностики in vitro»;
- символы опасности и сигнальное слово (на этикетке для набора реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт», картриджа «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки, картриджа с реагентами «ОФ» для станции пробоподготовки и картриджа «ОФ» с реагентами для секвенирования).

Место и способ нанесения маркировки: этикетка на клеящейся основе (ОСТ 29.1) на упаковку каждого реагента (пробирка, планшет, картридж, бутылка, чип) с информацией, нанесенной печатным способом.

Маркировка внешней (потребительской) упаковки набора реагентов должна содержать:

- наименование производителя;
- адрес, телефон и сайт производителя;
- полное и сокращенное наименование набора реагентов;
- состав Набора реагентов;
- номер по каталогу;
- номер серии;
- дата производства;
- срок годности;
- условия хранения;
- символ «Медицинское изделие для диагностики in vitro»;
- символ «Обратитесь к инструкции по применению»;
- символы опасности, сигнальное слово, список опасных компонентов, входящих в состав реагента, предупреждения об опасности (на этикетке изолирующего реагента, отмывочного буфера 2/3, протеазы, картриджа «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки, картриджа с реагентами «ОФ» для станции пробоподготовки и картриджа «ОФ» с реагентами для секвенирования);
- номер «Технических условий»;
- номер и дата регистрационного удостоверения.

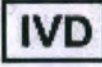
Место и способ нанесения маркировки: этикетка на клеящейся основе (ОСТ 29.1) с информацией, нанесенной печатным способом, или надпись, нанесенная типографским методом на внешней упаковке набора.

Маркировка транспортной упаковки должна содержать:

- наименование набора реагентов;
- наименование и адрес производителя;
- номер по каталогу;
- номер серии;
- дату изготовления набора реагентов (год, месяц включительно);
- срок годности набора реагентов (год, месяц включительно);
- требования к условиям хранения и транспортирования изделия;
- предупреждения и меры предосторожности в отношении изделия, которые необходимо исполнять при транспортировании, манипуляционные надписи;
- число единиц потребительской упаковки изделий;
- масса нетто и масса брутто.

Данная информация может быть нанесена в виде символов согласно ГОСТ Р ИСО 15223-1.

Расшифровка символов маркировки

	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Код партии
	Изделие для in vitro диагностики
	Номер в каталоге
	Символ опасности
	Опасность возгорания
	Опасность для здоровья
	Опасность коррозии
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Объем

11. УПАКОВКА

11.1. Внутренняя (потребительская) упаковка должна представлять собой индивидуальные коробки из картона коробочного по ГОСТ 33781, в которые помещены компоненты Набора реагентов №№ 1.1-1.11/2.1-2.10, паспорт качества и краткое руководство по применению набора.

11.2. Следующие компоненты Набора (№№ 1.1.5, 1.1.7, 1.1.8, 1.1.11, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.9, 1.11, 2.1.5, 2.1.7, 2.1.8, 2.1.11, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3.2, 2.4, 2.8, 2.10), хранящиеся при температуре -25 – -15°C, должны быть совместно упакованы в

совместную внешнюю упаковку (потребительскую тару) в пакеты из пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354:

Вариант исполнения «ОнкоФокус 64»:

- 1.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт» (Коробка 2 из 2, компоненты 1.1.5, 1.1.7, 1.1.8, 1.1.11) – 3 шт.;
- 1.2. Набор реагентов для обратной транскрипции;
- 1.3. Набор «ОФ» для ручного создания библиотек – 4 шт.;
- 1.4. Набор баркодов 1-16;
- 1.5. Набор для измерения концентрации библиотек;
- 1.9. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке);
- 1.11. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке).

Вариант исполнения «ОнкоФокус 32 авто»:

- 2.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт» (Коробка 1 из 2, компоненты 2.1.5, 2.1.7, 2.1.8, 2.1.11) – 2 шт.;
- 2.2. Набор реагентов для обратной транскрипции;
- 2.3. Набор реагентов «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек (компоненты 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3.2);
- 2.4. Набор для измерения концентрации библиотек;
- 2.8. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке);
- 2.10. Набор картриджей «ОФ» с реагентами для секвенирования (4 картриджа в упаковке).

Потребительская тара упаковывается в транспортную упаковку - термоконтейнер с холодоэлементами.

11.3. Следующие компоненты набора (№№ 1.1.1., 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4, 1.1.6, 1.1.9, 1.1.10, 1.6, 1.7, 1.8, 1.10, 2.1.1., 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.6, 2.1.9, 2.1.10, 2.3.3.1. (транспортирование при температуре окружающей среды, хранение при температуре +2 – +8°C), 2.3.3.3, 2.3.3.4., 2.5, 2.6., 2.7, 2.9), хранящиеся при температуре +15 – +30°C, должны быть совместно упакованы в совместную внешнюю упаковку (потребительскую тару) в пакеты из пленки полиэтиленовой:

Вариант исполнения «ОнкоФокус 64»:

- 1.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт» (Коробка 1 из 2, компоненты 1.1.1., 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4, 1.1.6, 1.1.9, 1.1.10) – 3 шт.;
- 1.6. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке) – 2 шт.;
- 1.7. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки – 4 шт.;
- 1.8. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке);
- 1.10. Набор растворов «ОФ» для секвенирования.

Вариант исполнения «ОнкоФокус 32 авто»:

- 2.1. Набор реагентов «РНК/ДНК ОнкоЭкстракт» (Коробка 1 из 2, компоненты 2.1.1., 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.6, 2.1.9, 2.1.10) – 2 шт.;
- 2.3. Набор реагентов «ОФ-авто» для автоматического создания библиотек (компонент 2.3.3.1. (транспортирование при температуре окружающей среды, хранение при температуре +2 – +8°C), 2.3.3.3, 2.3.3.4.);
- 2.5. Набор полупроводниковых чипов 520 (4 чипа в упаковке);
- 2.6. Набор материалов «ОФ» для станции пробоподготовки – 4 шт.;

2.7. Набор картриджей «ОФ» с растворами для амплификации библиотек для станции пробоподготовки (4 картриджа в упаковке);

2.9. Набор растворов «ОФ» для секвенирования.

Потребительская тара упаковывается в транспортную упаковку – ящик из картона гофрированного.

11.4. Транспортная упаковка представляет собой ящик из картона гофрированного.

11.5. Транспортная упаковка клеена упаковочной лентой общего назначения (скотчем) на полимерной или тканевой основе шириной не менее 45 мм. На каждую транспортную упаковку нанесена этикетка с транспортной маркировкой.

11.6. Термоконтейнеры с хладоэлементами для транспортирования компонентов набора №1.1.5, 1.1.7, 1.1.8, 1.1.11, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.9, 1.11, 2.1.5, 2.1.7, 2.1.8, 2.1.11, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3.2, 2.4, 2.8, 2.10 должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 27.

Таблица 27

Транспортная тара и вспомогательные материалы	Требования и нормы
Термоконтейнер одноразового использования	внутренний объем до 92 л, толщина стенок не менее 40 мм
Термоконтейнер многоразового использования	внутренний объем до 80 л, толщина стенок не менее 40 мм
Хладоэлементы	для поддержания температуры внутри термоконтейнера от -30 до -10°C при воздействии положительной температуры внешней среды

12. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «ОнкоФокус» направлять в адрес производителя АО «Ферст Генетикс»: 121205, Россия, г. Москва, территория инновационного центра "Сколково", Большой бульвар, дом 42, строение 1, помещение 619, тел. (499) 673-02-88, e-mail: info@f-genetics.com.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся

качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.f-genetics.com.

13. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Письмо Министерства здравоохранения РФ и Федерального фонда обязательного медицинского страхования от 19 сентября 2018 г. NN 17-9/10/2-6177, 11722/30/и "О типовых стандартизированных схемах лечения пациентов при злокачественных новообразованиях".
2. Тюляндин С.А. Таргетная терапия: двадцать лет успехов и поражений. Практическая онкология, Т. 20, №4, 2019, стр. 274-288.
3. Biomarker Tests for Molecularly Targeted Therapies: Key to Unlocking Precision Medicine. Washington (DC): National Academies Press (US); 2016.
4. Keller A., Harz C., Matzas M. et al. Identification of novel SNPs in glioblastoma using targeted resequencing. // PLoS One. 2011. V. 6. N. 6: e18158.
5. Guo G., Gui Y., Gao S. et al. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. // Nat Genet. 2011. V. 44. N. 1. P. 17–19.
6. Иванов М.В., Новикова Е.И., Баранова А.В. и др. Опыт использования высокопроизводительного секвенирования (NGS) для подбора таргетной терапии при немелкоклеточном раке легкого: преимущества и ограничения. // Международный ежеквартальный научно-практический журнал по онкологии "Злокачественные опухоли". Москва. 2015. №4. С.310-311.
7. Pleasance E D., Cheetham K., Stephens P J. et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. // Nature. 2010. V. 463. N. 7278. P. 191–196.
8. Berger M F., Lawrence M S., Demichelis F. et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. // Nature. 2011. V. 470. N. 7333. P. 214–220.
9. Ley T J., Mardis E R., Ding L. et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. // Nature. 2008. V. 456. N. 7218. P. 66–72.
10. Mardis E R., Ding L., Dooling D J. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. // N Engl J Med. 2009. V. 361. N. 11. P. 1058–1066.
11. Puente X S., Pinyol M., Quesada V. et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. // Nature. 2011. V. 475. N. 7354. P. 101–105.
12. Gui Y., Guo G., Huang Y. et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. // Nat Genet. 2011. V. 43. N. 9. P. 875–878.
13. Данные Национального института рака США (National Cancer Institute): <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>.
14. Seebacher, N.A., Stacy, A.E., Porter, G.M. et al. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 156 (2019).

14. ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ/ СТАНДАРТОВ

Таблица 28

Обозначение	Наименование
Приказ Минздрава России № 4н от 06.06.2012 г.	Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий
ГОСТ 12.1.005-88	Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ 14192-96	Маркировка грузов
ОСТ 29.1-2001	Этикетки, отпечатанные способами офсетной и флексографской печати. Издательско-полиграфическое оформление. Общие технические условия
ГОСТ 33781-2016	Упаковка потребительская из картона, бумаги и комбинированных материалов. Общие технические условия
ГОСТ Р 52901-2007	Картон гофрированный для упаковки продукции. Технические условия
ГОСТ 10354-82	Пленка полиэтиленовая. Технические условия
СанПиН 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности
ГОСТ Р 15.301-2016	Система разработки и постановки продукции на производство. Продукция производственно-технического назначения. Порядок разработки и постановки продукции на производство
ГОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

15. УТИЛИЗАЦИЯ

15.1. Утилизация набора реагентов должна проводиться специализированными службами согласно правилам и нормативам СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям,

эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

15.2. Неиспользованные наборы реагентов, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные наборы реагентов и упаковка должны быть утилизированы как отходы класса Г в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

15.3. Биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, должны быть утилизированы как отходы класса Б, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

16. ТРЕБОВАНИЯ К ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Информация, касающаяся экологической безопасности и воздействия на окружающую среду, содержится в листе безопасности на медицинское изделие.

Ввиду наличия в составе реактивов набора токсичных и опасных для природной среды веществ (гуанидин тиоцианат – вреден для водных организмов;) и отсутствия данных об устойчивости в объектах окружающей среды и биоаккумулятивности некоторых веществ, входящих в состав набора, в целях предупреждения вреда окружающей среде, здоровью и генетическому фонду человека следует:

- не допускать попадания реактивов в водостоки и сброса в окружающую среду,
- использовать, хранить и транспортировать набор строго в соответствии с инструкцией по применению,
- соблюдать меры безопасности при работе с набором,
- утилизировать использованные наборы, наборы с истекшим сроком годности согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21, предъявляемым к утилизации отходов класса Г.

При эксплуатации изделия не образуется вредных материалов, к которым необходимо предъявлять специальные требования при их утилизации.

Лист регистрации изменений

[illegible]



Пронумеровано, прошито и скреплено

148 лист (а/ов)

Генеральный директор
Акционерного общества
«Ферст Генетикс»

Н. А. Кузнецов