

ПАСПОРТ № 1 от 22.09.2022

Контрольная панель предприятия “КПП ABC плюс”

Контрольная панель предприятия “КПП ABC плюс” предназначена для контроля аналитической специфичности, правильности определения, предела обнаружения, воспроизводимости и повторяемости набора реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022.

Номер серии: 22092022

Контрольный номер: ОТК № 005

Дата изготовления: 22.09.2022

Количество в серии: 7 микропробирок

Наименование показателя (для каждого компонента из контрольной панели)	Характеристика и норма	Результаты контроля
Внешний вид	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Специфичность:		
Образец №1	наличие с.5329dup	Соответствует.
Образец №2	наличие с.5946del	Соответствует.
Образец №3	наличие с.5557G>A	Соответствует.
Образец №4	наличие с.573+1G>A	Соответствует.
Образец №5	наличие с.1592del	Соответствует.
Образец №6	наличие с.1624G>A	Соответствует.
Образец №7	Отсутствие генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует.
Концентрация ДНК	5 нг/мкл	Соответствует.
Объем	50 мкл	Соответствует.
Упаковка	Микропробирка объемом 0,5 (1,5 или 2) мл (Sarstedt, Германия)	Соответствует.
Маркировка	Этикетка из прозрачной пленки на клеевой основе с указанием сокращенного наименования предприятия-изготовителя, сокращенного наименования набор реагентов, названия компонента и его объема, номера серии, даты изготовления, срока годности (годен до) и условий хранения.	Соответствует.

Условия хранения: хранить при температуре от минус 22 до минус 20 °С.

Срок годности: 12 мес.

Директор

ООО «Онкодиагностика АТЛАС»



В.А. Милейко

ПАСПОРТ № 2

на медицинское изделие

«Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022»

Вариант исполнения «Соло-тест ABC плюс С-Б»	Номер серии 2/AB05-0922-С-Б	Дата изготовления 27.09.2022 Срок годности 27.09.2023
--	--------------------------------	--

Состав набора:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Название	Объем	Количество
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка
КО	24 мкл	1 пробирка

Комплект для приготовления библиотек:

Название	Объем	Количество
Активатор	96 мкл	1 пробирка
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка
Реагент В	4500 мкл	1 пробирка
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки
Олигонуклеотидные индексы: Си-7	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-8	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-9	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-10	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-11	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-12	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка

Название	Объем	Количество
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	12 мкл	1 пробирка

Комплект для подготовки образца к секвенированию:

Название	Объем	Количество
Раствор HT1	5 мл	1 пробирка
Картридж	35 мл	1 шт.

Комплект для секвенирования:

Название	Объем	Количество
Раствор PR2	500 мл	1 бутылка
Проточная кювета	15 мл	1 флакон

Результаты контроля:

Наименование показателя	Нормативные технические требования	Результаты контроля «Солю-тест ABC плюс С-Б», серия 2/AB05-0922-С-Б
1. ВНЕШНИЙ ВИД		
1.1. Раствор праймеров 1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.2. Раствор праймеров 2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.3. ПЦР-смесь 1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.4. КО	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.5. Активатор	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.6. Раствор Л	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.7. ДНК-лигаза	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.8. ЛС адаптеры	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.9. Магнитные частицы	Суспензия микрочастиц в прозрачной бесцветной жидкости с осадком коричневого цвета	Соответствует
1.10. Реагент В	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.11. ТЕ буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.12. ПЦР-смесь 2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.13. Олигонуклеотидные индексы: Си-7	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.14. Олигонуклеотидные индексы: Си-8	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.15. Олигонуклеотидные индексы: Си-9	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.16. Олигонуклеотидные индексы: Си-10	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.17. Олигонуклеотидные индексы: Си-11	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.18. Олигонуклеотидные индексы: Си-12	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует

Наименование показателя	Нормативные технические требования	Результаты контроля «Соло-тест ABC плюс С-Б», серия 2/AB05-0922-С-Б
1.19. Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.20. Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.21. Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.22. Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.23. Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.24. Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.25. Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.26. Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.27. Раствор HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.28. Картридж	Контейнер с раствором, окрашенным в фиолетовый цвет	Соответствует
1.29. Раствор PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.30. Проточная кювета	Флакон с кюветой, погруженной в бесцветную прозрачную жидкость	Соответствует
2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ		
2.1. Аналитическая чувствительность		
КО* (5 нг/мкл)	Детекция генетического варианта (мутация с.5329dup) в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует
2.2. Аналитическая специфичность		
КПП** (Образец №7 (5 нг/мкл))	Отсутствие детекции генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует
2.3. Предел обнаружения (LoD) - наименьшая частота мутантного аллеля в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, которую способно выявлять изделие		
КПП*** 5%	Совпадение результатов секвенирования с паспортом КПП	Соответствует
2.4. Правильность определения		
КПП** 100%	Совпадение результатов секвенирования с паспортом КПП	Соответствует
2.5. Повторяемость		
КПП** 100%	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью одного набора в условиях повторяемости	Соответствует
2.6. Воспроизводимость		
КПП** 100%	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью 2-х наборов одной серии в условиях воспроизводимости	Соответствует
Упаковка	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.5.)	Соответствует
Маркировка	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.6.)	Соответствует
Комплектность	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.4.)	Соответствует.
Срок годности	12 мес. (ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 5.5.)	Соответствует

*КО - препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №КО1.

**КПП - контрольная панель предприятия - 7 препаратов геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленных в соответствии с СОП №КПП1. Состав КПП представлен в таблице 7.

Таблица 7

Названия образца	Ген	Хромосома	Координата генетического варианта	Название генетического варианта	dbSNP / COSMIC ****
Образец №1	BRCA1	chr17	41209079	c.5329dup	rs1217805587
Образец №2	BRCA2	chr13	32914437	c.5946del	rs80359550
Образец №3	ATM	chr11	108175462	c.5557G>A	rs1801516
Образец №4	CHEK2	chr22	29121230	c.573+1G>A	rs121908698
Образец №5	PALB2	chr16	23646274	c.1592del	rs180177102
Образец №6	PIK3CA	chr3	178936082	c.1624G>A	COSV55873227
Образец №7	Отсутствие генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA				

***КПП 5% - препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №КПП1

**** dbSNP - COSMIC - COSMIC - база данных соматических мутаций, dbSNP - база данных наследственных генетических вариантов. Идентификатор указывается по одной из баз в соответствии с тем, в каком статусе она чаще встречается в биологических образцах.

Заключение:

«Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022», вариант исполнения «Соло-тест ABC плюс С-Б», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-005-91709359-2022.

Руководитель
производственного отдела



Е.Е. Желонкина



ПАСПОРТ № 3

на медицинское изделие

«Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022»

Вариант исполнения «Соло-тест ABC плюс А»	Номер серии 3/AB05-0922-A	Дата изготовления 26.09.2022 Срок годности 26.09.2023
--	------------------------------	--

Состав набора:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Название	Объем	Количество
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка
КО	24 мкл	1 пробирка

Комплект для приготовления библиотек:

Название	Объем	Количество
Активатор	96 мкл	1 пробирка
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка
Реагент В	4500 мкл	1 пробирка
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки
Олигонуклеотидные индексы: Си-1	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-2	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-3	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-4	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-5	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-6	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка

Название	Объем	Количество
Олигонуклеотидные индексы: Лп-4	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Лп-5	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Лп-6	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Лп-7	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Лп-8	12 мкл	1 пробирка

Результаты контроля:

Наименование показателя	Нормативные технические требования	Результаты контроля «Соло-тест ABC плюс А», серия 3/AB05-0922-A
1. ВНЕШНИЙ ВИД		
1.1. Раствор праймеров 1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.2. Раствор праймеров 2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.3. ПЦР-смесь 1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.4. КО	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.5. Активатор	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.6. Раствор Л	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.7. ДНК-лигаза	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.8. ЛС адаптеры	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.9. Магнитные частицы	Суспензия микрочастиц в прозрачной бесцветной жидкости с осадком коричневого цвета	Соответствует
1.10. Реагент В	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.11. ТЕ буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.12. ПЦР-смесь 2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.13.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Си-1		
1.14.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Си-2		
1.15.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Си-3		
1.16.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Си-4		
1.17.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Си-5		
1.18.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Си-6		
1.19.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Лп-1		
1.20.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Лп-2		
1.21.	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Олигонуклеотидные индексы: Лп-3		

Наименование показателя	Нормативные технические требования	Результаты контроля «Солю-тест ABC плюс А», серия 3/AB05-0922-A
1.22. Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.23. Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.24. Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.25. Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.26. Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.27. Раствор ПТ1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.28. Картридж	Контейнер с раствором, окрашенным в фиолетовый цвет	Соответствует
1.29. Раствор PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.30. Проточная кювета	Флакон с кюветой, погруженной в бесцветную прозрачную жидкость	Соответствует
2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ		
2.1. Аналитическая чувствительность		
КО* (5 нг мкл)	Детекция генетического варианта (мутация c.5329dup) в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует
2.2. Аналитическая специфичность		
КП1** (Образец №7 (5 нг мкл))	Отсутствие детекции генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует
2.3. Предел обнаружения (LoD) - наименьшая частота мутантного аллеля в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, которую способно выявлять изделие		
КП1*** 5%	Совпадение результатов секвенирования с паспортом КП1	Соответствует
2.4. Правильность определения		
КП1** 100%	Совпадение результатов секвенирования с паспортом КП1	Соответствует
2.5. Повторяемость		
КП1** 100%	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью одного набора в условиях повторяемости	Соответствует
2.6. Воспроизводимость		
КП1** 100%	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью 2-х наборов одной серии в условиях воспроизводимости	Соответствует
Упаковка	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.5.)	Соответствует
Маркировка	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.6.)	Соответствует
Комплектность	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.4.)	Соответствует
Срок годности	12 мес. (ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 5.5.)	Соответствует

*КО - препарат геномной ДНК человека (5 нг мкл), приготовленный в соответствии с СОП №КО1.

****КНП** – контрольная панель предприятия – 7 препаратов геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленных в соответствии с СОП №КНП1. Состав КНП представлен в таблице 7.

Таблица 7

Названия образца	Ген	Хромосома	Координата генетического варианта	Название генетического варианта	dbSNP / COSMIC ****
Образец №1	BRCA1	chr17	41209079	c.5329dup	rs1217805587
Образец №2	BRCA2	chr13	32914437	c.5946del	rs80359550
Образец №3	ATM	chr11	108175462	c.5557G>A	rs1801516
Образец №4	CHEK2	chr22	29121230	c.573-1G>A	rs121908698
Образец №5	PALB2	chr16	23646274	c.1592del	rs180177102
Образец №6	PIK3CA	chr3	178936082	c.1624G>A	COSV55873227
Образец №7	Отсутствие генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA				

*****КНП 5⁰** – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №КНП1

****** dbSNP, COSMIC** – COSMIC – база данных соматических мутаций, dbSNP – база данных наследственных генетических вариантов. Идентификатор указывается по одной из баз в соответствии с тем, в каком статусе она чаще встречается в биологических образцах.

Заключение:

«Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022», вариант исполнения «Соло-тест ABC плюс А», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-005-91709359-2022.

Руководитель
производственного отдела

Е.Е. Желонкина





ПАСПОРТ № 4

на медицинское изделие

«Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022»

Вариант исполнения «Соло-тест ABC плюс Б»	Номер серии 4/AB05-0922-Б	Дата изготовления 27.09.2022
		Срок годности 27.09.2023

Состав набора:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Название	Объем	Количество
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка
КО	24 мкл	1 пробирка

Комплект для приготовления библиотек:

Название	Объем	Количество
Активатор	96 мкл	1 пробирка
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка
Реагент В	4500 мкл	1 пробирка
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки
Олигонуклеотидные индексы: Си-7	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-8	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-9	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-10	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-11	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Си-12	16 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка

Название	Объем	Количество
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	12 мкл	1 пробирка
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	12 мкл	1 пробирка

Результаты контроля:

Наименование показателя	Нормативные технические требования	Результаты контроля «Солю-тест ABC плюс Б», серия 4/AB05-0922-Б
1. ВНЕШНИЙ ВИД		
1.1. Раствор праймеров 1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.2. Раствор праймеров 2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.3. ПЦР-смесь 1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.4. КО	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.5. Активатор	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.6. Раствор Л1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.7. ДНК-лигаза	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.8. ЛС адаптеры	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.9. Магнитные частицы	Суспензия микрочастиц в прозрачной бесцветной жидкости с осадком коричневого цвета	Соответствует
1.10. Реагент В	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.11. ТЕ буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.12. ПЦР-смесь 2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.13. Олигонуклеотидные индексы: Си-7	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.14. Олигонуклеотидные индексы: Си-8	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.15. Олигонуклеотидные индексы: Си-9	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.16. Олигонуклеотидные индексы: Си-10	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.17. Олигонуклеотидные индексы: Си-11	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.18. Олигонуклеотидные индексы: Си-12	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.19. Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.20. Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.21. Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует

Наименование показателя	Нормативные технические требования	Результаты контроля «Солю-тест ABC плюс Б», серия 4/AB05-0922-Б
1.22. Олигонуклеотидные индексы: Лп-4	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.23. Олигонуклеотидные индексы: Лп-5	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.24. Олигонуклеотидные индексы: Лп-6	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.25. Олигонуклеотидные индексы: Лп-7	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.26. Олигонуклеотидные индексы: Лп-8	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.27. Раствор НТ1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.28. Картридж	Контейнер с раствором, окрашенным в фиолетовый цвет	Соответствует
1.29. Раствор PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
1.30. Проточная кювета	Флакон с кюветой, погруженной в бесцветную прозрачную жидкость	Соответствует
2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ		
2.1. Аналитическая чувствительность		
КО* (5 нг мкл)	Детекция генетического варианта (мутация c.5329dup) в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует
2.2. Аналитическая специфичность		
КП1** (Образец №7 (5 нг мкл))	Отсутствие детекции генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA	Соответствует
2.3. Предел обнаружения (LoD) - наименьшая частота мутантного аллеля в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, которую способно выявлять изделие		
КП1*** 5%	Совпадение результатов секвенирования с паспортом КП1	Соответствует
2.4. Правильность определения		
КП1** 100%	Совпадение результатов секвенирования с паспортом КП1	Соответствует
2.5. Повторяемость		
КП1** 100%	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью одного набора в условиях повторяемости	Соответствует
2.6. Воспроизводимость		
КП1** 100%	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью 2-х наборов одной серии в условиях воспроизводимости	Соответствует
Упаковка	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.5.)	Соответствует
Маркировка	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.6.)	Соответствует
Комплектность	Визуально (согласно ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 1.4.)	Соответствует
Срок годности	12 мес. (ТУ 21.20.23-005-91709359-2022, п. 5.5.)	Соответствует

*КО - препарат геномной ДНК человека (5 нг мкл), приготовленный в соответствии с ОП №КО1.

****КПП** - контрольная панель предприятия - 7 препаратов геномной ДНК человека (5 нг мкл), приготовленных в соответствии с СОП №КППП. Состав КПП представлен в таблице 7.

Таблица 7

Названия образца	Ген	Хромосома	Координата генетического варианта	Название генетического варианта	dbSNP / COSMIC ****
Образец №1	BRCA1	chr17	41209079	c.5329dup	rs1217805587
Образец №2	BRCA2	chr13	32914437	c.5946del	rs80359550
Образец №3	ATM	chr11	108175462	c.5557G>A	rs1801516
Образец №4	CHEK2	chr22	29121230	c.573+1G>A	rs121908698
Образец №5	PALB2	chr16	23646274	c.1592del	rs180177102
Образец №6	PIK3CA	chr3	178936082	c.1624G>A	COSV55873227
Образец №7	Отсутствие генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA				

*****КПП 5⁰** - препарат геномной ДНК человека (5 нг мкл), приготовленный в соответствии с СОП №КППП

****** dbSNP - COSMIC** - COSMIC - база данных соматических мутаций, dbSNP - база данных наследственных генетических вариантов. Идентификатор указывается по одной из баз в соответствии с тем, в каком статусе она чаще встречается в биологических образцах.

Заключение:

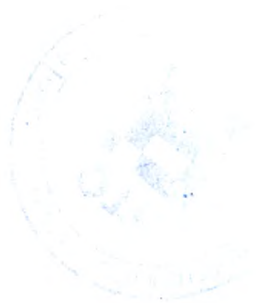
«Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022», вариант исполнения «Соло-тест ABC плюс Б», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-005-91709359-2022.

Руководитель
производственного отдела

Е.Е. Желонкина



Е.Е. Желонкина



УТВЕРЖДАЮ

Директор

«ООО «Онкодиагностика АТЛАС»

В.А. Милейко

«28» 12 2022 г.



РУКОВОДСТВО ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Солю-тест ABC плюс

Набор реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования

по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022

ООО «Онкодиагностика Атлас»

Содержание

Описание и назначение

Состав набора

Принцип действия набора

Характеристики набора

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор

Анализируемые образцы и пробоподготовка

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Общие правила и рекомендации для работы с набором

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

I. Проведение целевого обогащения ДНК

II. Приготовление библиотек ДНК

1. Удаление праймеров из ПЦР продуктов

2. Лигирование адаптеров к ампликонам

3. Первый этап очистки библиотек

4. Второй этап очистки библиотек

5. Преамплификация библиотеки

6. Очистка преамплифицированной библиотеки

7. Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения

III. Настройка параметров запуска

IV. Подготовка образцов к секвенированию

V. Секвенирование

VI. Интерпретация результатов

Набор «Соло-тест ABC плюс» предназначен для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, в образцах ДНК, выделенной из нормальной или опухолевой ткани человека, методом высокопроизводительного секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina) (ПУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014).

Показанием к применению набора является необходимость в одновременном выявлении носительства (отсутствия носительства) генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA у больных раком молочной железы, раком яичников, раком предстательной железы и раком поджелудочной железы.

В состав набора входит положительный контрольный образец. Его использование рекомендовано в каждом отдельном запуске, так как обеспечивает контроль правильности срабатывания теста и отсутствия контаминации.

Допустимо одновременное секвенирование библиотек, полученных набором «Соло-тест ABC плюс», и других библиотек при условии совместимости используемых индексов и корректном смешивании библиотек, чтобы на каждую библиотеку «Соло-тест ABC плюс», приготовленную из образцов ДНК, выделенной из крови, приходилось не менее 100 тыс. прочтений, а на каждую библиотеку «Соло-тест ABC плюс», приготовленную из образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани, приходилось не менее 270 тыс. прочтений.

Состав набора

Набор «Соло-тест ABC плюс» рассчитан на проведение анализа 48 образцов (включая контрольный образец).

Набор выпускается в четырех вариантах исполнения: «Соло-тест ABC плюс А», «Соло-тест ABC плюс Б», «Соло-тест ABC плюс С-А» и «Соло-тест ABC плюс С-Б». Варианты исполнения «Соло-тест ABC плюс С-А» и «Соло-тест ABC плюс С-Б» предназначены для проведения полного цикла исследования по выявлению генетических вариантов методом секвенирования ДНК, в то время как варианты исполнения «Соло-тест ABC плюс А» и «Соло-тест ABC плюс Б» включают только компоненты для целевого обогащения ДНК и приготовления библиотек. Варианты исполнения «Соло-тест ABC плюс А» и «Соло-тест ABC плюс Б» могут использоваться совместно с наборами «Соло-тест ABC плюс С-А» и «Соло-тест ABC плюс С-Б» при необходимости анализа более 48 образцов. Допускается объединять библиотеки ДНК, приготовленные с помощью разных наборов при условии, что в одном цикле секвенирования каждая комбинация индексов Си и Ли будет встречаться только 1 раз. В том числе допускается объединять библиотеки ДНК, приготовленные с помощью наборов в вариантах исполнения «Соло-тест ABC плюс А» с библиотеками «Соло-тест ABC плюс С-Б», а библиотеки «Соло-тест ABC плюс Б» допустимо объединять с библиотеками, приготовленными набором «Соло-тест ABC плюс С-А». Таким образом, в одном цикле секвенирования может быть объединено до 96 уникальных образцов, включая контроли. Для анализа наследственных мутаций рекомендовано секвенировать одновременно до 96 образцов, а для анализа соматических мутаций – не более 48 образцов в одном цикле секвенирования, что эквивалентно покрытию не менее 150х и 500х соответственно.

Варианты исполнения «Соло-тест ABC плюс А» и «Соло-тест ABC плюс Б» отличаются только наборами олигонуклеотидных индексов, аналогично «Соло-тест ABC плюс С-А» и «Соло-тест ABC плюс С-Б» различаются наборами олигонуклеотидных индексов. Чередование использования наборов с литерами «А» и «Б» позволяет избежать попадания примесей образцов из предыдущего анализа в процессе секвенирования.

Контрольный образец (КО) рекомендуется включать в каждую постановку в дополнение к анализируемым образцам. При этом объем этого компонента в наборе позволяет подготовить по 4 библиотеки контрольного образца.

Наборы «Соло-тест ABC плюс А» и «Соло-тест ABC плюс Б» включают два комплекта: Комплект для целевого обогащения ДНК (его необходимо хранить в пре-ПЦР зоне) и Комплект для приготовления библиотек (его необходимо хранить в пост-ПЦР зоне). Наборы «Соло-тест ABC плюс С-А» и «Соло-тест ABC плюс С-Б» включают четыре комплекта: Комплект для целевого обогащения ДНК (необходимо хранить в пре-ПЦР зоне), Комплект для приготовления библиотек (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне), Комплект для подготовки образца к секвенированию (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне) и Комплект для секвенирования (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне). Состав набора представлен в таблице 1.

Таблица 1
Состав набора «Соло-тест ABC плюс»

Наименование компонента	Цвет вкладыша на крышке	Объем	Хранение
Комплект для целевого обогащения ДНК			
ПЦР-смесь 1	Красный	192 мкл	От -20 до -22°C
Раствор праймеров 1	Желтый	240 мкл	От -20 до -22°C
Раствор праймеров 2	Желтый	240 мкл	От -20 до -22°C
КО	Черный	24 мкл	От -20 до -22°C
Комплект для приготовления библиотек ДНК			
Реагент В	Белая круглая этикетка с символом В	4500 мкл	От -20 до -22°C
ТЕ буфер	Белая круглая этикетка с символом ТЕ	2 пробирки × 4500 мкл	От -20 до -22°C
ПЦР-смесь 2	Черный	2 пробирки × 1152 мкл	От -20 до -22°C
Активатор	Зеленый	96 мкл	От -20 до -22°C
Раствор Л	Желтый	192 мкл	От -20 до -22°C
ДНК-лигаза	Синий	96 мкл	От -20 до -22°C
ЛС адаптеры	Прозрачный	96 мкл	От -20 до -22°C
Олигонуклеотидные индексы Си	Зеленый, круглая этикетка с номером индекса	6 пробирок × 16 мкл	От -20 до -22°C
Олигонуклеотидные Индексы Ли	Фиолетовый, круглая этикетка с номером индекса	8 пробирок × 12 мкл	От -20 до -22°C
Магнитные частицы	Нет вкладыша	3840 мкл	От +2 до +8°C
Комплект для подготовки образца к секвенированию			

Раствор HT1	1 пробирка	5 мл	От -20 до - 22°C
Картридж	1 шт.	35 мл	От -20 до - 22°C
Комплект для секвенирования			
Раствор PR2	1 бутылка	500 мл	От +2 до +8°C
Проточная кювета	1 флакон	15 мл	От +2 до +8°C

Принцип действия набора

Набор предназначен для приготовления ДНК-библиотек. В основе работы набора лежит амплификация целевых участков ДНК методом мультиплексной ПЦР.

Процесс состоит из 3 этапов приготовления библиотеки и секвенирования с использованием прибора Illumina MiSeq.

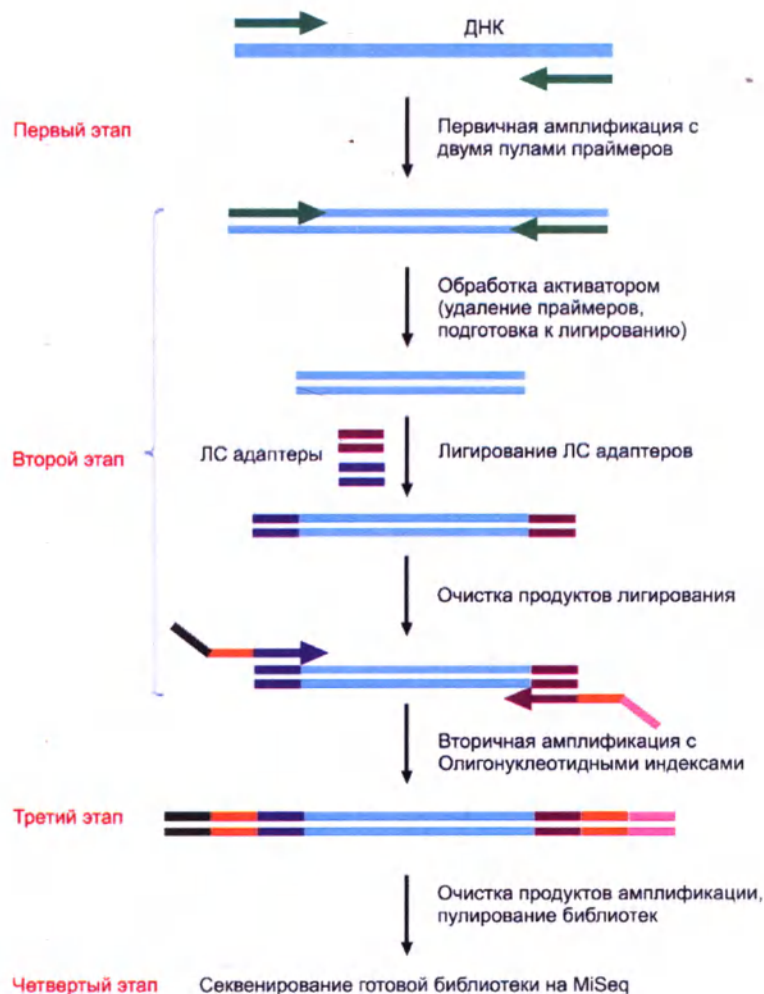
Первый этап: ДНК, выделенная из биоматериала пациента, используется для наработки целевых фрагментов при помощи мультиплексной ПЦР (Первичная амплификация).

Второй этап: Удаление праймеров с концевых участков продуктов ПЦР и лигирование к ним олигонуклеотидных адаптеров, необходимых для последующего секвенирования библиотеки. Очистка библиотек на магнитных частицах.

Третий этап: Вторичная амплификация и очистка библиотек. На данном этапе проводится индексирование библиотек. Для каждого образца ДНК используется собственная уникальная комбинация олигонуклеотидных индексов, которая позволяет соотнести каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования.

Четвертый этап: Секвенирование. На данном этапе происходит секвенирование полученных библиотек на приборе Illumina MiSeq. Анализ полученных данных осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0.0 от 08.01.2018).

Принцип работы набора проиллюстрирован на рисунке:



Набор включает следующие комплекты:

- **Комплект для целевого обогащения ДНК**

Комплект для целевого обогащения ДНК необходим для обогащения фрагментами ДНК, содержащими целевые регионы генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHECK2, PALB2, PIK3CA. Для осуществления первого этапа - постановки первичной амплификации (мультиплексной ПЦР) - используется смесь реагентов для амплификации («ПЦР-смесь 1») и набор праймеров, состоящий из двух отдельных пулов (в пробирках «Раствор праймеров 1» и «Раствор праймеров 2»). Реакция амплификации выполняется отдельно для каждого пула праймеров. Остальные компоненты для проведения ПЦР-реакции входят в состав «ПЦР-смеси 1». Кроме того, в Комплект входит контрольный образец (пробирка «КО»). Контрольный образец содержит генетический вариант c.5329dup в гене BRCA1 и позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования, а также позволяет контролировать отсутствие ложноположительных результатов. Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК приводится в таблице 2.

Таблица 2

Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК

Название	Описание
Раствор праймеров 1	Необходим для наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые мутации, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
Раствор праймеров 2	Необходим для наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые мутации, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)

ПЦР-смесь 1	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения первичной амплификации ДНК (мультиплексной ПЦР)
КО	Водный раствор ДНК человека, содержащей мутацию с.5329dup в гене BRCA1. Он позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования

• **Комплект для приготовления библиотек**

Комплект для приготовления библиотек необходим для приготовления библиотек из продуктов ПЦР, полученных с помощью Комплекта для целевого обогащения ДНК.

По завершении ПЦР-реакции продукты амплификации, полученные с использованием двух пулов праймеров для одного исходного образца ДНК, объединяются. На следующем этапе происходит удаление праймеров с концов полученных продуктов ПЦР и подготовка к лигированию с помощью «Активатора». Далее проводится лигирование универсальных адаптеров (пробирка «ЛС адаптеры») к продуктам амплификации с помощью «раствора Л» и «ДНК-лигазы». После этого проводится очистка полученных фрагментов ДНК с помощью «Магнитных частиц». На следующем этапе проводится вторичная амплификация для введения олигонуклеотидных индексов, комбинация которых уникальна для каждого исходного образца ДНК (пробирки «Олигонуклеотидные индексы», «ПЦР-смесь 2»). Введение таких индексов позволяет проводить одновременное секвенирование множества образцов за один запуск прибора. Далее проводится очистка полученного продукта ПЦР с использованием «Магнитных частиц», «Реагента В» и «ТЕ буфера». После очистки необходимо измерить концентрацию получившихся библиотек, довести их концентрацию до 4000 пмоль/л, и смешать в равных объемах. Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек приводится в таблице 2.

Таблица 3

Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек

Название	
Активатор	Обеспечивает удаление праймеров с концов продуктов первичной амплификации и подготовку концевых участков фрагментов к последующему лигированию.
Раствор Л	Обеспечивает работу ДНК-лигазы (содержит необходимые для ее работы компоненты), необходим для лигирования ЛС адаптеров
ДНК-лигаза	Лигирует («пришивает») ЛС адаптеры к наработанным в результате первичной амплификации фрагментам ДНК
ЛС адаптеры	Короткие двуцепочечные олигонуклеотиды, необходимые для проведения вторичной амплификации (являются местом отжига для Олигонуклеотидных индексов), а также для проведения секвенирования
Магнитные частицы	Необходимы для очистки целевых фрагментов ДНК (от ЛС адаптеров, Олигонуклеотидных индексов)
Реагент В	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от свободных Олигонуклеотидных индексов
ТЕ буфер	Необходим для элюции фрагментов ДНК после очистки на Магнитных частицах от свободных Олигонуклеотидных индексов
ПЦР-смесь 2	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения вторичной амплификации ДНК
Олигонуклеотидные индексы Си	Необходимы для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца и позволяют атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования
Олигонуклеотидные индексы Ли	Необходимы для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца и позволяют атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования

Диагностические характеристики и параметры секвенирования

Значения диагностических характеристик набора по данным клинических испытаний

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Результаты испытаний	
		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
		с доверительной вероятностью 95%	
Суммарно по всем образцам	300	98,0-100%	98,0-100%
Ткань опухоли	100	94,2-100%	94,2-100%
Цельная кровь	100	94,2-100%	94,2-100%
FFPE-блоки	100	94,2-100%	94,2-100%

Параметры секвенирования:

1) Для образцов ДНК, выделенных из FFPE-блоков

Метрика	Значение	Тип значения
Расчётная чувствительность	0.98	минимальное
Процент целевых чтений	40%	минимальное
Равномерность покрытия пула 1 (MAPD)	0.7	максимальное
Равномерность покрытия пула 2 (MAPD)	0.7	максимальное
Средняя глубина покрытия пула 1	400x	минимальное
Средняя глубина покрытия пула 2	400x	минимальное
Средняя глубина покрытия целевой последовательности	500x	минимальное
Процент целевых позиций с покрытием меньше 50x	5%	максимальное

2) Для образцов ДНК, выделенных из цельной крови

Метрика	Значение	Тип значения
Расчётная чувствительность	0.98	минимальное
Процент целевых чтений	40%	минимальное
Равномерность покрытия пула 1 (MAPD)	0.7	максимальное
Равномерность покрытия пула 2 (MAPD)	0.7	максимальное
Средняя глубина покрытия пула 1	100x	минимальное
Средняя глубина покрытия пула 2	100x	минимальное
Средняя глубина покрытия целевой последовательности	150x	минимальное
Процент целевых позиций с покрытием меньше 30x	10%	максимальное

- 3) Для образцов ДНК, выделенных из свежесобранного операционного или биопсийного материала

Метрика	Значение	Тип значения
Расчётная чувствительность	0.98	минимальное
Процент целевых чтений	40%	минимальное
Равномерность покрытия пула 1 (MAPD)	0.7	максимальное
Равномерность покрытия пула 2 (MAPD)	0.7	максимальное
Средняя глубина покрытия пула 1	400x	минимальное
Средняя глубина покрытия пула 2	400x	минимальное
Средняя глубина покрытия целевой последовательности	500x	минимальное
Процент целевых позиций с покрытием меньше 50x	5%	максимальное

Срок годности набора 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор

Наименование	Пример модели и производителя
ПЦР-бокс	БАВ-ПЦР-“Ламинар-С”; (620.100) (ЗАО “Ламинарные системы”, Россия)
Термоциклер	Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad, США)
Магнитный штатив	Магнитный штатив 96-луночный DynaMag™-96 Side (Thermo Fisher Scientific Inc., США)
Вортекс	Вортекс персональный V-1 plus (BioSan, Латвия)
Спектрофотометр NanoDrop	NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США)
Дозаторы переменного объема со сменными наконечниками	Дозаторы переменного объема со сменными наконечниками с диапазонами измерения от 0,5 до 10 мкл, от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл (Eppendorf, Германия)
Салфетки безворсовые	Салфетки безворсовые Kimwipes (KimTech Science)
Центрифуга лабораторная	Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 5430, с принадлежностями (Thermo Fisher Scientific, Германия)
Пробирки 1,5 мл или 2 мл	Пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф, DNA LoBind, PCR clean, бесцветные (Eppendorf, Германия)
Стриповые микропробирки	MicroAmp® 8-Tube Strip, 0.2 ml #N8010580
Наконечники для дозаторов с фильтром	Разные модели и производители
Штативы для пробирок	Разные модели и производители
Штатив для стрипов и планшетов	Разные модели и производители
Штативы для пробирок разного объема (50 мл, 15 мл, 1,5 – 2,0 мл, 0,5 мл)	Разные модели и производители
Пробирки типа Falcon 50 мл	Разные модели и производители
Спирт этиловый лабораторный, 96%	Разные модели и производители
Вода деионизованная бидистиллированная	Разные модели и производители
Перчатки резиновые	Разные модели и производители

Холодильная камера, поддерживающая температуру 2-8°C	Разные модели и производители
Морозильная камера, поддерживающая температуру от -20 до -22°C.	Разные модели и производители

Для экстракции ДНК из исследуемых образцов дополнительно понадобятся:

1. При работе с образцами цельной крови, свежего операционного и биопсийного материала - набор «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» или «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro».
2. При работе с образцами парафиновых блоков (FFPE) – набор «ДНК-Ткань-Ф».

Для секвенирования библиотек дополнительно понадобятся:

1. Генетический секвенатор MiSeq («Illumina Inc.», США)
2. MiSeq Reagent kit v2 (300 cycles) (для наборов Соло-тест ABC плюс А и Соло-тест ABC плюс Б)
3. Раствор 1,0 М NaOH.

Анализируемые образцы и пробоподготовка

Для работы с набором необходимо использовать образцы ДНК, выделенные из цельной крови, а также из свежесобранного операционного или биопсийного материала пациента, либо фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки).

Для цельной крови необходимо соблюдать следующие требования: взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Для свежего биопсийного и операционного материала следует соблюдать следующие требования: время до анализа не должно превышать двух часов с момента взятия материала.

Для длительного хранения следует применять формалиновую фиксацию материала с последующим заключением образцов в формалин (FFPE-блоки).

Для парафиновых блоков (FFPE) необходимо соблюдать следующие требования: предварительно провести их морфологический анализ. Образцы считаются пригодными для анализа если ткань опухоли занимает не менее 80% площади препарата. В случае невыполнения данного условия рекомендуется подготовить гистологический препарат биоматериала и по результатам гистологического исследования провести разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли. В дальнейшем, для выделения ДНК необходимо использовать отмеченную область препарата, содержащую опухолевую ткань. Для проведения исследования рекомендуется использовать фрагмент парафинового блока, соответствующий следующим параметрам: толщина каждого среза от 5 до 6 мкм; суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани и комплексов клеток человека от 2 см². Хранить и транспортировать материал в парафиновых блоках (FFPE) необходимо при температуре от +5 до +40 °С с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Выделение ДНК из образцов цельной крови, свежего операционного и биопсийного материала осуществляется с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (РУ №ФСР 2012/14019 от 06.09.2013), «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018» (РУ №РЗН 2019/9331 от 02.12.2019), из парафиновых блоков (FFPE) – с помощью набора «ДНК-Ткань-Ф» (№ РЗН 2018/7772 от 30.10.2018).

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК с концентрацией **не менее 5 нг/мкл**.
Минимальная валидированная концентрация ДНК – 2 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения поглощения света образцом ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки. Анализируемая ДНК должна храниться и транспортироваться при температуре от 2 °С до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°С.

Общие правила и рекомендации для работы с набором

- Все манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах.
- Протокол описан для работы с индивидуальными пробирками, но позволяет работать как с образцами в формате 96-луночной планшеты, так и в формате 8-луночных стрипов.
- При работе с набором используйте пластик, рекомендованный производителем вашего ПЦР амплификатора. Не допускайте испарения реакций.
- На протяжении всего протокола необходимо использовать наконечники для дозаторов с фильтром, которые необходимо менять для каждого образца и каждого компонента.
- Делайте общие ПЦР смеси для создания максимально одинаковых условий ПЦР для разных образцов. При расчете финальных объемов общих смесей, закладывайте запас в 10% на ошибки работы дозаторов.
- Вязкие жидкости отбирайте медленно. Тщательно перемешивайте растворы, компонентами которых являются данные реактивы. ПЦР-смесь 1, ПЦР-смесь 2, Активатор и ДНК-лигазу можно перемешивать только кратковременным вортиксованием или пипетированием.
- Избегайте кросс-контаминации при работе с Олигонуклеотидными индексами: чаще меняйте перчатки и открывайте пробирки с индексами по очереди.
- Если в пробирке с Раствором Л и с ПЦР-смесью 2 виден осадок, растворите его вортиксованием или пипетированием, чтобы осадок полностью растворился.
- За 30 минут до начала работы с Реагентом В поместите его на комнатную температуру, тщательно перемешайте реактивы после разморозки.
- Реагент В при -20°С может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен. В любом случае, после достижения Реагентом В комнатной температуры, необходимо тщательно перемешать Реагент В. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.
- За 30 минут до начала работы с Магнитными частицами поместите их на комнатную температуру и тщательно вортикуйте, чтобы перемешать частицы. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.
- Для приготовления 70% этилового спирта смешайте 96% этиловый спирт с водой в расчете 270 мкл спирта на 100 мкл воды на один образец. Используйте только свежеприготовленный 70% спирт!

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

При получении набора:

1. Снять внешнюю упаковку (пленку)
2. Комплект для целевого обогащения ДНК перенести и хранить в пре-ПЦР зоне в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C
3. Комплект для приготовления библиотек перенести и хранить в пост-ПЦР зоне
4. «Магнитные частицы» убрать в холодильную камеру, хранить при температуре +2 +8°C
5. Комплект для приготовления библиотек (без «Магнитных частиц») хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C.

Для наборов «Соло-тест ABC плюс С-А» и «Соло-тест ABC плюс С-Б»:

6. Комплект для подготовки образца к секвенированию хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C
7. Комплект для секвенирования хранить в холодильной камере при температуре +2 +8°C

I. Проведение целевого обогащения ДНК

ВНИМАНИЕ! Работа проводится в Пре-ПЦР зоне

Потребуется:

- ПЦР-смесь 1
- Раствор праймеров №1
- Раствор праймеров №2
- КО
- Анализируемые образцы ДНК (5 нг/мкл)

В каждую постановку в дополнение к образцам рекомендуется ставить КО.

1. Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на необходимое количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию
ПЦР-смесь 1	2 мкл
Раствор праймеров (№1 или №2)	5 мкл
Всего	7 мкл

2. Смешать в отдельных пробирках по 3 мкл образца с 7 мкл каждого раствора для амплификации. Общий объем каждой реакционной смеси составит 10 мкл. Пробирки должны быть совместимы с используемым термоциклером.

ВНИМАНИЕ! Сначала раскатать по индивидуальным пробиркам готовые растворы для амплификации, затем отдельными наконечниками - исследуемые образцы и КО.

3. Пробирки с образцами и контролями плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.
4. Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации:
- 5.

Количество циклов	Шаг	Т°С	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °С	15 мин
19 циклов	Денатурация	99 °С	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °С	4 мин
1 цикл	Хранение	4°С	∞

ВАЖНО! ПЦР продукт может храниться 1 ночь при 4-10°С, при более долгом хранении ПЦР продукт должен храниться при –20°С.

II. Приготовление библиотек ДНК

ВНИМАНИЕ! Далее работа проводится в Пост-ПЦР зоне

1. Удаление праймеров из ПЦР продуктов

Потребуется:

- ПЦР продукт
- Активатор

1. Для каждого образца объединить продукты ПЦР из обеих пробирок (с Праймерами №1 и №2). Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.
2. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР. Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.
3. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура, °С	Время	Кол-во циклов
50	10 мин	1
55	10 мин	
73	20 мин	
10	Хранение не более 1 часа	

ВАЖНО! При необходимости пробирки можно хранить при температуре не выше -20°С.

2. Лигирование адаптеров к ампликонам

Потребуется:

- ПЦР продукт, обработанный Активатором
- Раствор Л
- ЛС адаптеры
- ДНК-лигаза

4. Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л согласно расчету:

Компонент	Объем на 1 реакцию
ЛС адаптеры	2 мкл
Раствор Л	4 мкл
Всего	6 мкл

5. Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.

6. Добавить по 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки Активатором. Тщательно перемешать пипетированием. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.
7. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку, перемешать пипетированием. Общий объем смеси составит 30 мкл. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.
8. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°C	30 минут
72°C	10 минут
10°C	(хранение до 1 часа)

ВАЖНО! При необходимости пробирки можно хранить при температуре не выше -20°C.

ВНИМАНИЕ! Если планируете перейти к Первому этапу очистки библиотек, поместите магнитные частицы на комнатную температуру и тщательно провортексируйте, чтобы перемешать частицы.

3. Первый этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- Магнитные частицы
- Деионизированная вода

ВАЖНО! За 30 минут до начала работы с Магнитными частицами поместите их на комнатную температуру и тщательно провортексируйте, чтобы перемешать частицы.

9. Смешать суспензию Магнитных частиц с деионизированной водой согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию
Магнитные частицы	22 мкл
Деионизированная вода	20 мкл
Всего	42 мкл

10. Внести 42 мкл приготовленной суспензии в каждую пробирку с библиотекой, перемешать пипетированием, инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
11. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
12. Перенести супернатант в новую чистую пробирку, не задевая осадок частиц.

ВАЖНО! Супернатант содержит библиотеку.

4. Второй этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- Магнитные частицы
- Свежеприготовленный 70% этанол

ВНИМАНИЕ! Поместите ПЦР-смесь 2 на комнатную температуру, она понадобится на этапе Преамплификации библиотек п.23.

13. Внести 58 мкл Магнитных частиц (неразведенных!) в каждую пробирку с супернатантом, содержащую библиотеку, тщательно перемешать пипетированием.
14. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
15. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
16. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить п. 15-16.

ВАЖНО! Библиотека содержится на магнитных частицах!

17. Добавить к Магнитным частицам по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку и подождать 30 секунд, не снимая пробирку с магнитного штатива.
18. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирке. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и вернуться к п. 18.
19. Повторить шаги 17-18 для повторной промывки магнитных частиц.
20. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить капли кратковременным центрифугированием, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая из магнитного штатива.

ВАЖНО! Не пересушить магнитные частицы. Если частицы пересушены, на них заметны потрескивания.

После окончания сушки сразу же приступить к следующему этапу.

5. Преамплификация библиотеки

Потребуется:

- Полученная библиотека на магнитных частицах
- ПЦР-смесь 2
- Олигонуклеотидные индексы Си
- Олигонуклеотидные индексы Ли

ВНИМАНИЕ! Поместите Реагент В и ТЕ на комнатную температуру, он понадобится на этапе *Очистки преамплифицированной библиотеки* п.28.

21. Добавить в каждую пробирку по 48 мкл ПЦР-смеси 2.
22. Добавить по 2 мкл одного Олигонуклеотидного индекса Си и одного Олигонуклеотидного индекса Ли. В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация Олигонуклеотидных индексов — это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Индексы из наборов с литерами «А» и «Б» можно комбинировать между собой.
23. Зафиксировать комбинации номеров индексов, соответствующие каждому образцу в таблице (см. Приложение или <http://oncoatlas.ru/abcplus>).
24. Перемешать содержимое на вортексе, чтобы ресуспендировать магнитные частицы и осадить на центрифуге для сбора капель. Установить пробирки в термоциклер.
25. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
--------	-------------	-------

1 цикл	95°C	2 минуты
6 циклов	95°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

ВАЖНО! Не допускается замораживание смеси библиотек с магнитными частицами при -20°C. После окончания ПЦР амплификации приступить к следующему этапу.

6. Очистка преамплифицированной библиотеки

Потребуется:

- Полученная библиотека на магнитных частицах
- Реагент В
- Свежеприготовленный 70% этанол
- ТЕ буфер

26. Тщательно перемешать на вортексе Реагент В перед использованием (Реагент В при 20°C может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен, однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент В до комнатной температуры и тщательно перемешать). Добавить 85 мкл Реагента В в каждую библиотеку и тщательно перемешать на вортексе. Коротко осадить центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек., чтобы сбросить капли.

27. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

28. Поместить пробирку на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

29. Добавить к Магнитным частицам 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола и подождать 30 секунд, не снимая пробирку с магнитного штатива. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

30. Повторить шаг 31 для повторной промывки магнитных частиц.

31. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить кратковременным центрифугированием, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку, повторить инкубацию и отобрать спирт заново. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая пробирку из магнитного штатива.

ВАЖНО! Не пересушить магнитные частицы. Если частицы пересушены, на них заметны потрескивания.

32. Удалить пробирку с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ буфера.

33. Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадить на центрифуге для сбора капель.

34. Поместить пробирку на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести супернатант с готовыми ДНК библиотеками в новую пробирку, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

7. Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения

Дополнительная нормализация может не проводиться при условии использования одинаковой концентрации ДНК образцов при приготовлении библиотек. Однако, рекомендуется перед разведением измерить концентрацию полученных библиотек на флуориметре Qubit 3.0 с использованием набора Qubit®dsDNA HS Assay Kit.

35. Развести библиотеки деионизированной водой, свободной от нуклеаз, до концентрации 4 нмоль/л (эквивалентно 0,680 нг/мкл) используя 15 мкл исходной библиотеки. Рекомендуется использовать пробирки DNA LoBind.

36. Если полученная концентрация библиотеки данного образца ниже требуемой (4 нмоль/л), образец признается непригодным для секвенирования.

37. Смешать в равных объемах библиотеки, планируемые к секвенированию. Для анализа наследственных мутаций рекомендовано секвенировать одновременно от 3 до 96 образцов, а для анализа соматических мутаций – от 3 до 48 образцов (включая контрольный образец) в одном запуске секвенирования, что эквивалентно покрытию не менее 150x и 500x соответственно.

ВАЖНО! Неразведенные библиотеки хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C.

Полученные библиотеки готовы к секвенированию на MiSeq.

III. Настройка параметров запуска

1. Запуск секвенатора и анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0. и выше) - специализированного программного обеспечения, встроенного в секвенатор MiSeq.
2. Скачайте файл template_ABCplus (<https://oncoatlus.ru/abcplus>) и поместите его в папку Local Run Manager/templates. Запустите программу **Local Run Manager**. Зайдите в раздел Menu, пункт TOOLS и выберите раздел Library Prep Kit (рис. 1).



Рис. 1 Окно главного меню в Local Run Manager.

3. Открыв раздел Add Library Prep Kit, найдите файл template_ABCplus, откройте его. Теперь template файл успешно загружен (Рис. 2).

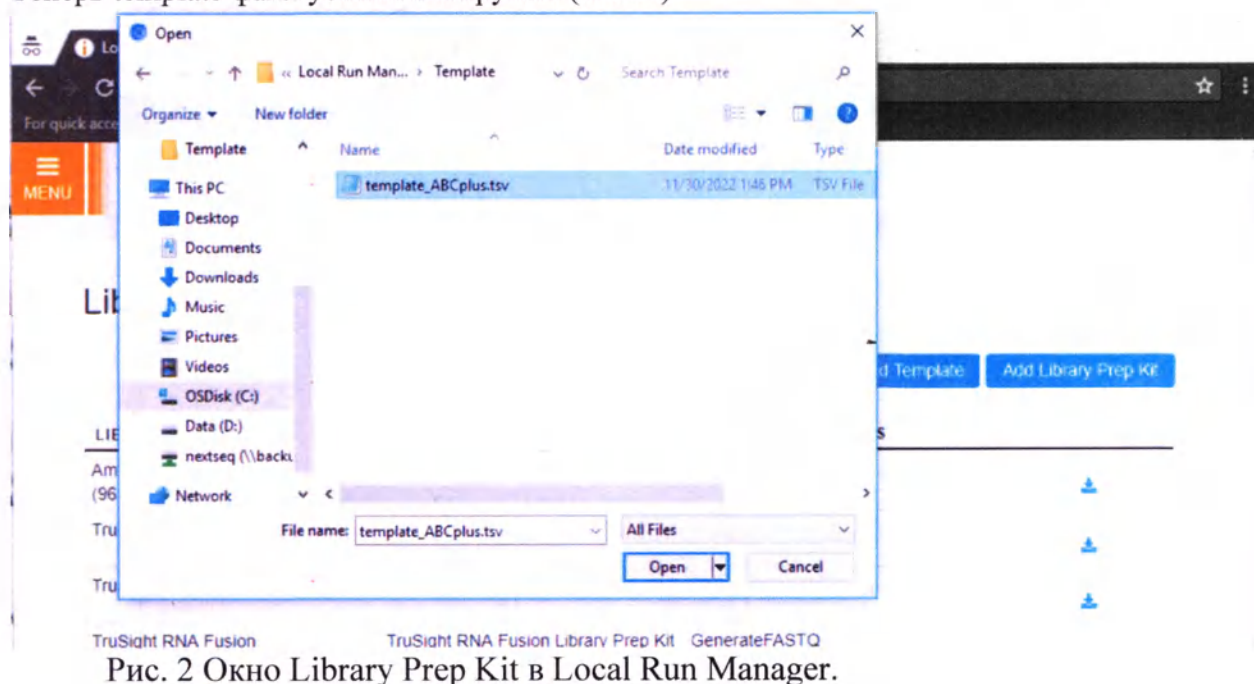


Рис. 2 Окно Library Prep Kit в Local Run Manager.

- Подобным образом в MENU в разделе Modules & Manifests добавьте манифест файл Manifest_ABCplus (<https://oncoatlas.ru/abcplus>).
- Создайте новый запуск (Run), нажав кнопку **Create Run** и выбрав вариант DNA Amplicon (Рис. 3).

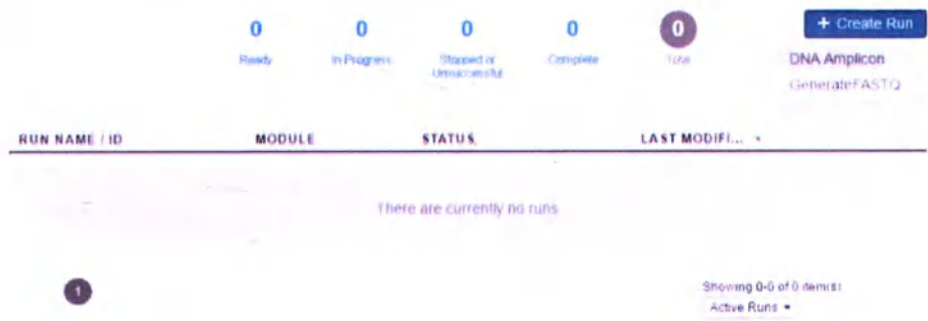


Рис. 3 Главное окно Local Run Manager.

- В поле **Run Name** задайте имя вашего запуска. В поле **Library Prep Kit** выберите вариант SolotestABCplus, после чего ряд настроек автоматически заполнится (рис. 4).

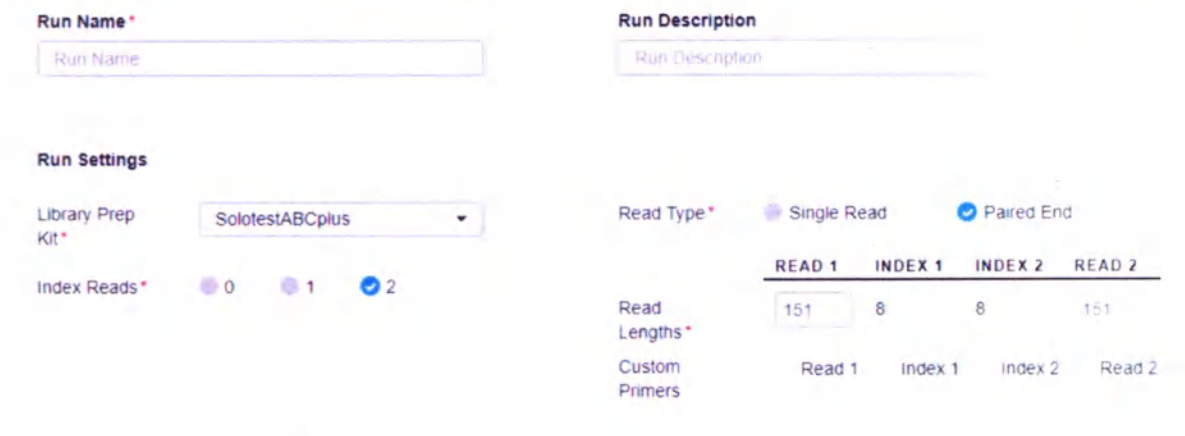


Рис. 4. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

7. Далее необходимо ввести следующие настройки запуска (рис. 5):

Module-Specific Settings

Variant Caller * Somatic

Variant Caller Depth Filter * 20

Variant Frequency * 5

Aligner * BWA

Indel Realignment * On

Genotype of Interest VCF + Add a Genotype VCF File

Import VCF

Annotation * ☒ RefSeq ☐ Ensembl ☐ None

Sample Identification

Analysis

[Show advanced module settings](#)

Рис. 5. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

8. Ниже необходимо заполнить информацию об образцах. Для этого в таблице указать название образца (Sample ID), использованную для каждого образца комбинацию индексов, выбрать манифест файл (Manifest – Manifest_ABCplus.txt), а также указать источник эталонной последовательности для человека (Genome - в качестве референсной последовательности используется версия сборки генома человека GRCh37/hg19) (Рис. 6):

Import Manifests Show Index Sequence

	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (I1) *	INDEX 2 (I2) *	MANIFEST *	SAMPLE PROJECT
1	245					

+ 1 Rows

Cancel Save File

MANIFEST NAME
Manifest_ABCplus.txt

Рис. 6. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

9. Сохранить настройки. Далее, после запуска секвенирования Local Run Manager будет ожидать завершения процесса и начнет анализ данных автоматически по завершению работы секвенатора (Рис. 7)



Рис. 7. Главное окно Local Run Manager.

IV. Подготовка образцов к секвенированию

1. Извлечь картридж из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
2. Поместить картридж с реактивами в водяную баню, содержащую воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя погружать картридж глубже линии, указанной на его боковой поверхности (рис.8).

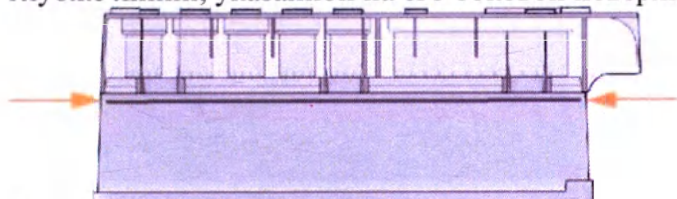


Рис. 8 Линия максимального уровня воды

3. Оставить картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания на 60 минут.
4. Разморозить раствор НТ1 при комнатной температуре, тщательно перемешать и оставить во льду.
5. Приступить к подготовке библиотеки: приготовить 1 мл свежего раствора 0,2 М NaOH путем смешивания 800 мкл деионизированной воды и 200 мкл 1 М NaOH.
6. Приготовить эквимольную смесь ДНК библиотек (далее «пулированную библиотеку»): разморозить (если была заморожена), тщательно перемешать. В одном анализе (цикле секвенирования) могут быть объединены до 96 ДНК-библиотек (при объединении библиотек, приготовленных несколькими наборами соответствующих вариантов исполнения), включая контрольные образцы.
7. Смешать в чистой пробирке 5 мкл пулированной библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 М NaOH. Тщательно перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре 5 минут.
8. Добавить к смеси 990 мкл охлажденного раствора НТ1. Тщательно перемешать. Теперь концентрация пулированной библиотеки составляет 20 пМ.
9. Выбрать конечную концентрацию библиотеки для внесения в картридж (стандартно 12 пМ, но может быть скорректировано). Развести библиотеки до конечной концентрации, используя объёмы реагентов, приведенные в таблице, тщательно перемешать и сбросить капли кратким центрифугированием.

Концентрация	8 пМ	10 пМ	12 пМ	15 пМ
20 пМ библиотека	240 мкл	300 мкл	360 мкл	450 мкл
Охлажденный НТ1	360 мкл	300 мкл	240 мкл	150 мкл

10. Загрузить образцы в картридж. Для этого вынуть картридж из водяной бани и осторожно постучать им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытереть основание картриджа насухо.
11. Перевернуть картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно проверить, что все позиции оттаяли, равномерно перемешаны и не содержат осадка.
12. Осторожно постучать картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактивах.
13. Очистить безворсовой салфеткой колпачок из фольги, покрывающий емкость, отмеченную оранжевой окружностью.
14. Проколоть колпачок из фольги чистым наконечником для пипетки на 1 мл.
15. Внести с помощью пипетки 600 мкл подготовленной пулированной библиотеки в резервуар, отмеченный оранжевой окружностью. Не касаться колпачка из фольги (рис.9).



Рис. 9 Загрузка библиотек

V. Секвенирование

1. Открыть программу MiSeq Control Software, перейти в раздел секвенирование, затем в окно Local Run Manager, выбрать там созданный ранее запуск. Убедиться в соответствии заданных ранее условий запуска параметрам, представленным на экране (парные чтения длиной 151+151, двойное чтение индексов).
2. Надеть новую пару неопудренных перчаток.
3. Пользуясь пластиковыми щипцами, захватить проточную кювету за основание пластмассового кейса и извлечь ее из емкости (рис.10).



Рис. 10 Извлечение проточной кюветы

4. Тщательно промыть проточную кювету деионизированной водой до тех пор, пока стеклянная ячейка и пластиковый кейс не будут тщательно отмыты от избытка солей

(рис.11). Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах анализа.



Рис. 11 Промывка проточной кюветы

5. Насухо протереть проточную кювету (рис.11) безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой.

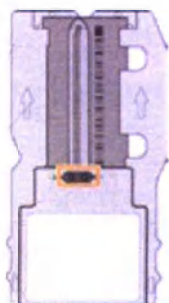


Рис.12 Отверстия и прокладка проточной кюветы

6. Протереть стекло проточной кюветы спиртовой салфеткой (рис.13). Удостовериться в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки. Не протирать спиртовой салфеткой область прокладки проточной кюветы.

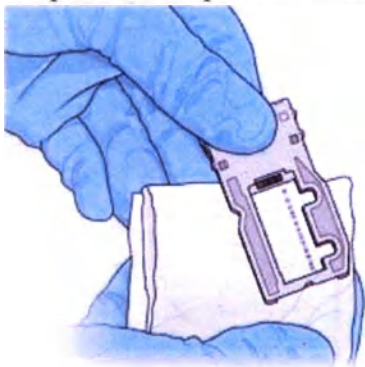


Рис.13 Сушка проточной кюветы

7. Избыток спирта протереть безворсовой салфеткой.
8. Удостовериться в том, что в отверстиях проточной кюветы нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы.
9. Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно вернуть ее на место и добиться того, чтобы она надежно располагалась вокруг отверстий кюветы.

Загрузка проточной кюветы

10. Поднять дверцу отсека проточной кюветы и нажать кнопку справа от защелки проточной кюветы. Защелка проточной кюветы откроется (рис.14).

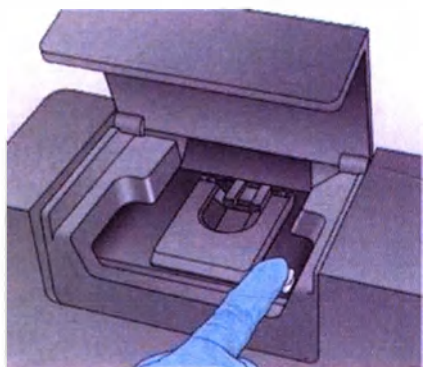


Рис. 14 Открывание защелки проточной кюветы

11. Убедиться в том, что на площадке проточной кюветы отсутствует ворс. Если на площадке есть волокна или иные загрязнения, протереть площадку начисто спиртовой салфеткой или безворсовой тканью, смоченной этанолом. Тщательно протереть поверхность площадки проточной кюветы — она должна быть чистой и сухой.

12. Удерживая проточную кювету за края, поставить ее на площадку проточной кюветы (рис.15).

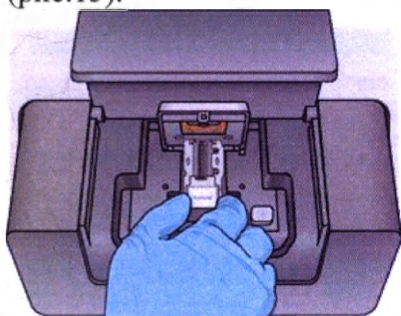


Рис. 15 Установка проточной кюветы на столик

13. Осторожно нажать на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой.

14. Когда защелка проточной кюветы закрывается, два центровочных штырька позиционируют проточную кювету. Если вы услышали щелчок, это означает, что защелка проточной кюветы надежно закреплена (рис.16).

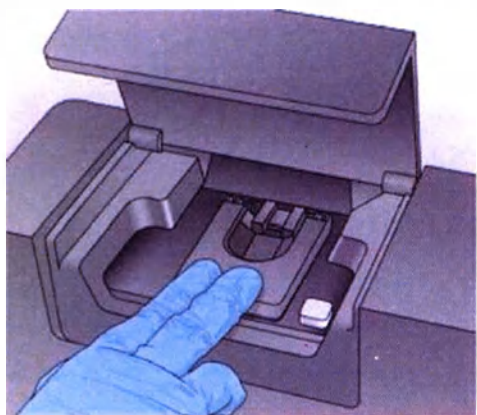


Рис.16 Закрывание защелки проточной кюветы

15. Закрывать дверцу отсека проточной кюветы.
 16. Нажать на экране Next (Далее).
- Загрузка раствора PR2 и проверка бутылки для сбора отходов
17. Извлечь флакон с раствором PR2 из хранилища с температурой от 2 до 8°C. Перевернуть для перемешивания, а затем снять крышку.
 18. Открыть дверцу отсека с реактивами.
 19. Поднять сипперную рукоятку.
 20. Извлечь промывную бутылку и загрузить бутылку с раствором PR2 (рис.17).

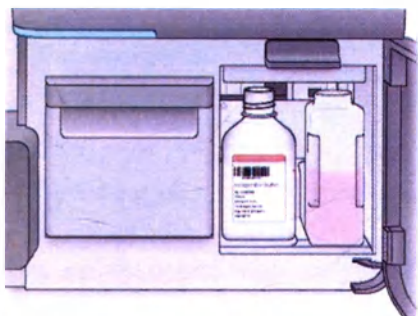


Рис. 17 Загрузка бутылки с раствором PR2

21. Перелить содержимое бутылки для сбора отходов в соответствующий контейнер для отходов.
22. Медленно опустить сипперную рукоятку вниз до конца. Убедиться в том, что сипперные трубки опустились во флакон с раствором PR2 и в бутылки для сбора отходов (рис.18).

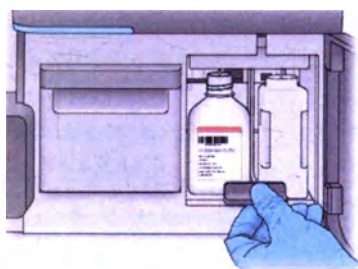


Рис.18 Опускание сипперной рукоятки

23. Нажать на экране Next (Далее).
24. Открыть дверцу холодильника для реактивов. Извлечь промывочный картридж.
25. Придерживая картридж с реактивами за рукоятку, вставить его в холодильник для реактивов до упора (рис.19).

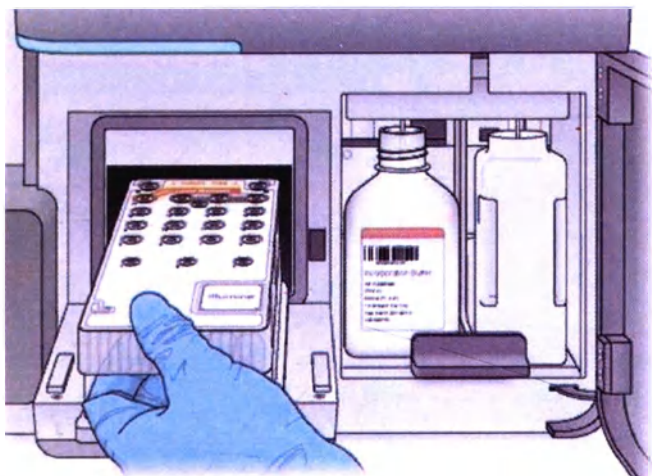


Рис.19 Загрузка картриджа с реактивами

26. Закрыть дверцу отсека для охлаждения реактивов (слева).
27. Закрыть дверцу отсека с реактивами (справа).
28. Нажать на экране Next (Далее).
29. После загрузки проточной кюветы и реактивов, выполнить предварительную проверку устройства, затем запустить секвенатор MiSeq.

VI. Интерпретация результатов

1. После окончания анализа на секвенаторе MiSeq, проведенного с помощью программного обеспечения Local Run Manager (версия 2.0. и выше), результаты будут сохранены в виде файла формата VCF. Для доступа к файлам необходимо открыть папку Alignment на жестком диске MiSeq. Путь к папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data Intensities\Basecalls\Alignment.
2. Все найденные по результатам анализа мутации сохраняются в формате VCF (рис 20). Файлы в формате VCF сохраняются в папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data Intensities\Basecalls\Alignment.

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	8789_S14.bam
chr13	32914437	rs80359550	GT	G	100	PASS	DP=834,clinvar= GT:GQ:AD:DP:VF:NL:SB:NC 0/1:100:71,63:134:0.470:20:-100.0000:0.0000		

Рис. 20 Пример файла VCF

Файл в формате VCF представляет собой таблицу с разделением табуляцией, в котором описывается следующая информация о мутациях в образце (по столбцам):

- A. Хромосома (CHROM).
- B. Позиция на хромосоме (POS).
- C. ID мутации в базах данных (RS ID, COSMIC ID и т.п.). Может не указываться. В таком случае пишется просто точка ('.').
- D. Референсный аллель (REF).
- E. Альтернативный аллель (ALT).
- F. Значение качества найденной мутации (QUAL). В зависимости от программы, выполняющей поиск мутации, значения могут различаться по величине. Может не указываться. В таком случае пишется просто точка ('.').
- G. Показатель, прошла ли мутация фильтры программы, выполняющей поиск мутаций (FILTER). Может иметь значение либо "PASS" (мутация удовлетворяет всем фильтрам

программы), либо иное значение, которое варьируется в зависимости от программы. Может не указываться. В таком случае пишется просто точка (‘.’).

Н. Аннотация мутации (INFO): описание патогенности в базе данных ClinVar, номера в базах данных мутаций (например, COSMIC ID), тип мутации (somatic, germline, frameshift и т.д.).

И. Описание формата записи характеристик позиции с мутацией (FORMAT): GT - Genotype, генотип, GQ - Genotype Quality, качество предсказания генотипа, AD - Allele Depth, глубина прочтения альтернативного аллеля, DP - Total Depth Used For Variant Calling, глубина прочтения позиции, VF - Variant Frequency, частота вариантного аллеля, NL - Applied BaseCall Noise Level, уровень шума, SB - StrandBias Score, показатель наличия одного и того же варианта в прямой и обратной цепях, NC - Fraction of bases which were uncalled or with basecall quality below the minimum threshold, доля чтений с мутациями в данной конкретной позиции, не попавшими в итоговый результат, например, по причине низкого качества.

Ж. Информация о глубине прочтения позиции с мутацией, аллельной частоте мутации, глубине прочтения альтернативного аллеля.

3. Каждый файл, соответствующий результатам анализа отдельного образца, имеет имя следующего вида: “SampleName_S#.vcf”, где SampleName - это название образца, которое было задано при создании протокола анализа, а знак “#” соответствует порядковому номеру образца в протоколе анализа. Без использования специализированного программного обеспечения открыть файлы следует с помощью текстового редактора по умолчанию: например, “Блокнот” (NotePad) или WordPad.

4. Полученные данные должны соответствовать следующим параметрам:

- 1) % считываний, сопоставленных с целевыми регионами - 40%, не менее.
- 2) % мишеней (целей, target) с указанным перекрытием (более 20x) - более 98%.
- 3) коэффициент дублирования - не применим для данного Набора.
- 4) частота вариантных аллелей - не менее 0.05.
- 5) локальная глубина секвенирования (показатель качества) - пороговое значение 20.
- 6) наличие одного и того же варианта в прямой и обратной цепях - значение параметра SB в файле формата VCF не должно превышать “-3.01”
- 7) качество картирования последовательности считываний (MAPQ в файле VCF, в Local Run Manager обозначается как ‘Percent Q30 Bases’ в разделе ‘Base Level Statistics’) - не менее 30 (Average mapping quality).
- 8) Для проверки показателя средней глубины покрытия в программе Local Run Manager. необходимо перейти в раздел “Samples & Results” проанализированного запуска. Во вкладке “Aggregate Report” в разделе “Coverage Summary” будет указано значение «Amplicon Mean Coverage» - средней глубины прочтения для каждого проанализированного образца в запуске. Средняя глубина прочтения считается достаточной, если она превышает значение 150 чтений, для образцов ДНК, выделенной из цельной крови, и не менее 500 чтений, для образцов ДНК, выделенных из свежесобранного операционного или биопсийного материала пациента, либо фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки)..

Sample Information

Sample ID	Total PF Reads	Percent Q30 Bases	Percent On-target Aligned Reads	Autosome Call Rate
8634	484,222	89.71%	91.21%	99.67%

Amplicon Summary

Manifest	Number of Amplicon Regions	Total Length of Target Regions
manifest.txt	517	52,617 bp

The number of amplicon regions and total length do not include the expected off-target regions that are included in the read and base level statistics.

Read Level Statistics

Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
1	167,099	69.02%
Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
2	161,777	66.82%

Base Level Statistics

Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
1	94.27%	18,009,814	49.26%	0.38%
Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
2	85.16%	17,413,147	47.63%	0.52%

The values for aligned bases exclude bases aligning to the probe sequences.

Variants Summary

	SNVs	Insertions	Deletions
Total Passing	29	4	5
Percent Found in dbSNP	79.31%	25.00%	100.00%
Het/Hom Ratio	8.667	-	-
Ts/Tv Ratio	6.250	-	-

Variants by Sequence Context

	SNVs	Insertions	Deletions
In Genes	29	4	5
In Exons	19	0	1
In Coding Regions	18	0	1
In UTR Regions	1	0	0
In Splice Site Regions	0	0	0

Genes include exons, introns and UTR regions. Exons include coding and UTR regions. UTR regions include 5' and 3' UTR regions. Splice site regions include regions annotated as splice acceptor, splice donor, splice site or splice region.

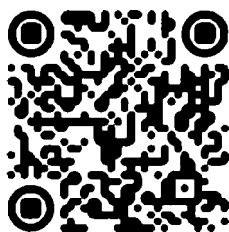
Рисунок 21. Local Run Manager, описание параметров анализируемого образца

5. Генетический вариант в генах BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA считается обнаруженным, если в файле содержится запись следующего вида (на примере контрольного образца):

Запись в vcf-файле					ген	мутация
chr17	41209079	rs1217805587	T	TG	BRCA1	5329dup

В случае отсутствия записей данного вида следует считать, что в исследуемом образце отсутствуют генетические варианты в исследуемых генах.

Для автоматического анализа данных можно воспользоваться ПО Соло-репорт. Для получения доступа к ПО, а также для помощи в анализе данных вы можете связаться с нами, написав на solo-test@oncoatlas.ru. Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по QR-коду:



Производитель: ООО «Онкодиагностика Атлас»

Юридический адрес:

Российская Федерация, г. Москва, ул. Малая Никитская д. 31/1

e-mail: solo-test@oncoatlas.ru

<http://oncoatlas.ru/abcplus>.

Приложение 1.

Таблица соответствия комбинаций индексов исследуемым образцам.

«Соло-тест ABC плюс А», «Соло-тест ABC плюс С-А»				«Соло-тест ABC плюс Б», «Соло-тест ABC плюс С-Б»			
№ образца	Название образца	Индекс Си	Индекс Ли	№ образца	Название образца	Индекс Си	Индекс Ли
		Си-1	Ли-1	1		Си-7	Ли-1
		Си-1	Ли-2	2		Си-7	Ли-2
		Си-1	Ли-3	3		Си-7	Ли-3
		Си-1	Ли-4	4		Си-7	Ли-4
		Си-1	Ли-5	5		Си-7	Ли-5
		Си-1	Ли-6	6		Си-7	Ли-6
		Си-1	Ли-7	7		Си-7	Ли-7
		Си-1	Ли-8	8		Си-7	Ли-8
		Си-2	Ли-1	9		Си-8	Ли-1
		Си-2	Ли-2	10		Си-8	Ли-2
		Си-2	Ли-3	11		Си-8	Ли-3
		Си-2	Ли-4	12		Си-8	Ли-4
		Си-2	Ли-5	13		Си-8	Ли-5
		Си-2	Ли-6	14		Си-8	Ли-6
		Си-2	Ли-7	15		Си-8	Ли-7
		Си-2	Ли-8	16		Си-8	Ли-8
		Си-3	Ли-1	17		Си-9	Ли-1
		Си-3	Ли-2	18		Си-9	Ли-2
		Си-3	Ли-3	19		Си-9	Ли-3
		Си-3	Ли-4	20		Си-9	Ли-4
		Си-3	Ли-5	21		Си-9	Ли-5
		Си-3	Ли-6	22		Си-9	Ли-6
		Си-3	Ли-7	23		Си-9	Ли-7
		Си-3	Ли-8	24		Си-9	Ли-8
		Си-4	Ли-1	25		Си-10	Ли-1
		Си-4	Ли-2	26		Си-10	Ли-2
		Си-4	Ли-3	27		Си-10	Ли-3
		Си-4	Ли-4	28		Си-10	Ли-4
		Си-4	Ли-5	29		Си-10	Ли-5
		Си-4	Ли-6	30		Си-10	Ли-6
		Си-4	Ли-7	31		Си-10	Ли-7
		Си-4	Ли-8	32		Си-10	Ли-8
		Си-5	Ли-1	33		Си-11	Ли-1
		Си-5	Ли-2	34		Си-11	Ли-2
		Си-5	Ли-3	35		Си-11	Ли-3
		Си-5	Ли-4	36		Си-11	Ли-4
		Си-5	Ли-5	37		Си-11	Ли-5
		Си-5	Ли-6	38		Си-11	Ли-6
		Си-5	Ли-7	39		Си-11	Ли-7
		Си-5	Ли-8	40		Си-11	Ли-8
		Си-6	Ли-1	41		Си-12	Ли-1
		Си-6	Ли-2	42		Си-12	Ли-2
		Си-6	Ли-3	43		Си-12	Ли-3
		Си-6	Ли-4	44		Си-12	Ли-4
		Си-6	Ли-5	45		Си-12	Ли-5
		Си-6	Ли-6	46		Си-12	Ли-6
		Си-6	Ли-7	47		Си-12	Ли-7
		Си-6	Ли-8	48		Си-12	Ли-8



Всего листов 30



Общество с ограниченной ответственностью
«Онкодиагностика АТЛАС»,
[ООО «Онкодиагностика АТЛАС»]
121069, Россия, Москва, ул. Малая Никитская,
д. 31, стр. 1, эт. 1, помещ. 4.
ИНН: 5408287687, КПП: 773101001, ОГРН: 1115476059401

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
ООО «Онкодиагностика АТЛАС»
В.А. Милейко
2022 г.

**Инструкция по применению
стандартного образца предприятия
Контрольный образец №1**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Контрольный образец предприятия "КО ABC плюс" предназначен для проведения внешнего контроля качества лабораторных исследований: одновременного выявления клинически значимых генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA.

2. ОПИСАНИЕ

Контрольный образец предприятия "КО ABC плюс" представляет собой раствор геномной ДНК человека в TE-буфере в концентрации 5 нг/мкл. Концентрация ДНК определена спектрофотометрически, генотип установлен с помощью секвенирования по Сэнгеру. Образцы не содержат агентов, способных к размножению и являются биологически безопасными.

3. АТТЕСТОВАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Концентрация ДНК (5 нг/мкл) определялась спектрофотометрически с помощью анализатора NanoDrop 2000с (Свидетельство об утверждении типа средств измерений №56026-13).

Генотип BRCA1 - с.5329dup (NC_000023.10:g.33038255C>A). Наличие мутации с.5329dup в гене BRCA1 подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

1. ПЦР-боксы БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" (620.100) (ЗАО "Ламинарные системы", Россия).
2. Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения MiSeq, MiSeqDx (MiSeq) («IlluminaInc.», США).
3. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (Thermo Fisher Scientific Inc., США).
4. Магнитный штатив для 96-луночных планшет DynaMag™-96 Side (Thermo Fisher Scientific Inc., США).
5. Вортекс персональный V-1 plus (SIA «BioSan», Латвия).
6. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Step One, с принадлежностями (Life Technologies Corporation, США).
7. Спектрофотометр UV-1800 с принадлежностями (SHIMADZU CORPORATION, Япония).
8. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research® Plus с принадлежностями (Eppendorf AG, Германия).
9. Салфетки безворсовые Kimwipes (Kimberly-Clark Corporation, США).
10. Пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф, DNA LoBind, PCR clean, бесцветные, (Eppendorf, Германия).
11. Штатив для пробирок 0,5 мл «рабочее место» на 200 лунок.
12. Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 54xx, с принадлежностями (Centrifuge 5403) (Eppendorf AG, Германия).
13. Штатив для стрипов и планшетов, 96 лунок.
14. Штатив «рабочее место» для 96-стрипованных пробирок объемом 0,2 мл.
15. Четырехсторонний штатив для пробирок разного объема (50 мл, 15 мл, 1,5 – 2,0 мл, 0,5 мл).
16. Перчатки нитриловые неопудренные.
17. Спирт этиловый лабораторный, 96%.

18. Холодильная камера, поддерживающая температуру 2-8 °С.
19. Морозильная камера, поддерживающая температуру – 20 – 22 °С.
20. Вода деионизированная бидистиллированная.

5. УСЛОВИЯ И ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ.

Контрольный образец предприятия может использоваться для контроля эффективности определения мутаций генов BRCA1 и BRCA2 самостоятельно.

КО полностью готов к применению и не требует разведения при использовании с набором реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022. Образец рекомендовано использовать в двух повторностях.

Подготовка и проведение анализа

Для анализа использовать КО в двух повторностях и КО в 2-кратном разведении также в двух повторностях. Разморозить КО при комнатной температуре. Встряхнуть на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирок.

Приготовить двукратное разведение КО, смешав 5 мкл КО и 5 мкл деионизированной воды в отдельной пробирке на 0.5 мл. Перемешать на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирки.

Все дальнейшие манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах!

Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на необходимое количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 4 реакции
ПЦР-смесь 1	2 мкл	8 мкл
Раствор праймеров (№1 или №2)	5 мкл	20 мкл
Всего	7 мкл	

Смешать в отдельных пробирках по 3 мкл КО с 7 мкл каждого раствора для амплификации. Общий объем каждой реакционной смеси составит 10 мкл.

Пробирки с образцами плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.

Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации следующим образом:

Количество циклов	Шаг	Т°С	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °С	15 мин
19 циклов	Денатурация	99 °С	15 сек

	Отжиг и элонгация	60 °C	4 мин
1 цикл	Хранение	4°C	∞

Перед выполнением дальнейших манипуляций пробирки с продуктами ПЦР бережно перемешать, не допуская образования пузырей, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

Перемешать содержимое каждой пробирки кратковременным вортиксованием, после чего сбросить капли с крышек кратковременным центрифугированием. Объединить продукты ПЦР каждого образца. Для этого последовательно перенести 10 мкл реакционной смеси из каждой пробирки одного стрипа в пробирку второго стрипа того же порядкового номера, соответствующую одному и тому же образцу. Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.

Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР.

Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура, °C	Время	Кол-во циклов
50	10 мин	1
55	10 мин	
73	20 мин	
10	Хранение не более 1 часа	

По окончании выполнения программы извлечь пробирки из реакционного модуля прибора. При необходимости, пробирки можно хранить при температуре не выше минус 20°C.

Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л для лигирования согласно расчету:
(без учета потерь при пипетировании ~10%)

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 4 реакций
ЛС адаптеры	2 мкл	8 мкл
Раствор Л	4 мкл	16 мкл

Всего	6 мкл	24 мкл
-------	-------	--------

Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.

Добавить 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки активатором. Пипетировать 10 раз.

Добавить 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°C	30 минут
72°C	10 минут
10°C	(хранение до 1 часа)

Вынуть пробирки из термоциклера.

Подготовить рабочую смесь Магнитных частиц с деионизованной водой из расчета, как указано в таблице ниже. Тщательно перемешать смесь на вортексе. Рабочая смесь используется только на первом этапе очистки. На втором этапе очистки используются неразведенные Магнитные частицы.

	На 1 реакцию	На 4 реакций
Деионизованная вода	20 мкл	80 мкл
Магнитные частицы	22 мкл	88 мкл

Внести 42 мкл рабочей смеси в каждую пробирку, содержащую библиотеку. Тщательно перемешать содержимое на вортексе и осадить на центрифуге для сбора капель. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Приготовить пустой стрип из набора и аккуратно перенести в него супернатант из каждой пробирку в соответствующую пробирку нового стрипа, не задевая осадок.

В каждую пробирку к супернатанту, полученному ранее добавить 58 мкл неразведенного раствора Agencourt®AMPure®XPReagent. Тщательно перемешать содержимое стрипа на вортексе и осадить на центрифуге для сбора капель. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно удалить

супернатант из каждой пробирки, не задевая осадок. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл.

Приготовить свежий 70% этанол, смешав 95% спирт с водой в расчете 2,3 мл 96% этанола на 1,0 мл деионизированной воды.

Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирках.

Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирках.

Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из лунок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц на пробирках. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая из магнитного штатива. Не пересушивать магнитные частицы. После окончания сушки сразу же приступить к следующему шагу.

Добавить в каждую пробирку 48 мкл ПЦР-микс. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы. Добавить по 2 мкл одного Олигонуклеотидного индекса Си и одного Олигонуклеотидного индекса Ли. В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация Олигонуклеотидных индексов — это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Каждому образцу соответствует свой Индекс. Важно зафиксировать соответствие номера образца и Индекса.

Перемешать содержимое на вортексе. Установить пробирки в термоциклер.

Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	95°C	2 минуты
6 циклов	95°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

Тщательно провортексировать Реагент В перед использованием (Реагент В при -20 °C может оставаться в жидком состоянии. Либо может быть частично заморожен. Однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент В до комнатной температуры и тщательно перемешать). Добавить 85 мкл Реагента В в каждую библиотеку, и тщательно вортексировать для того, чтобы полностью перемешать компоненты суспензии. Коротко осадить на центрифуге, чтобы сбросить капли. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

Поместить стрип, на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в лунках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы в лунке.

Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в лунке.

Добавить еще раз по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в лунке.

Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из лунок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц на лунках. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая стрип из магнитного штатива. Не пересушивать магнитные частицы.

Удалить стрип с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ Буфера для диспергирования магнитных частиц. Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадите на центрифуге для сбора капель.

Поместить стрип на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести готовые ДНК библиотеки в новые чистые пробирки, не задевая магнитных частиц.

Неразведенные библиотеки могут храниться на 4-8°C до 1 месяца. Для более длительного хранения поместите библиотеки на -20°C.

Развести библиотеки до концентрации 4000 пмоль/л (эквивалентно 680 нг/мл) используя 15 мкл исходной библиотеки. Смешайте в равных объемах полученные разведенные библиотеки. Одновременно могут быть проанализированы (секвенированы) библиотеки контрольных образцов из варианта исполнения набора Соло-тест АВС плюс.

Извлечь картридж из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C. Поместить картридж с реактивами в водяную баню, содержащую деионизированную воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя погружать картридж глубже, чем до линии, указанной на его упаковке. Оставить картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания на 60 минут.

Разморозить раствор НТ1 при комнатной температуре, тщательно перемешать и оставить охлаждаться во льду. Приготовить 1 мл свежего раствора 0,2 М NaOH путем смешивания 800 мкл деионизированной воды и 200 мкл 1,0 М NaOH.

Приготовить эквимольную смесь ДНК библиотек (далее «пулированную библиотеку»): разморозить (если была заморожена), тщательно перемешать.

Смешать в чистой пробирке 5 мкл пулированной библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 М NaOH. Тщательно перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре 5 минут. Добавить к смеси 990 мкл охлажденного раствора НТ1. Тщательно перемешать.

Вынуть картридж из водяной бани и осторожно постучать им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытереть основание картриджа насухо. Перевернуть картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно проверить, что все позиции оттаяли, равномерно перемешаны и не содержат осадка.

Осторожно постучать картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактиве. Очистить колпачок из фольги, покрывающий емкость с надписью: “Загрузка образцов” безворсовой лабораторной салфеткой. Проколоть колпачок из фольги чистым наконечником для пипетки на 1 мл.

Внести с помощью пипетки 600 мкл подготовленной пулированной библиотеки в резервуар с пометкой “Загрузка образцов”, не касаясь колпачка из фольги.

Создать новую программу цикла в соответствии с инструкцией к генетическому секвенатору MiSeq, указав соответствующие номера индексов для каждого образца. Надеть новую пару неопудренных перчаток, пользуясь пластиковыми щипцами, захватить проточную кювету за основание пластмассового кейса и извлечь ее из емкости.

Слегка промыть проточную кювету водой лабораторного класса, до тех пор, пока стеклянная ячейка и пластиковый кейс не будут тщательно отмыты от избытка солей.

Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах анализа.

Насухо протереть проточную кювету безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой.

Протереть стекло проточной кюветы спиртовой салфеткой. Удостовериться в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки. Не протирать спиртовой салфеткой область прокладки проточной кюветы. Избыток спирта протереть безворсовой салфеткой для очистки оптики.

Удостовериться в том, что в отверстиях проточной кюветы нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы. Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно вернуть ее на место и добиться того, чтобы она надежно располагается вокруг отверстий кюветы. Поднять дверцу отсека проточной кюветы и нажать кнопку справа от защелки проточной кюветы.

Убедиться в том, что на площадке проточной кюветы отсутствует ворс. Если на площадке есть волокна или иные загрязнения, протереть площадку начисто спиртовой салфеткой или безворсовой тканью, смоченной этанолом. Тщательно протереть поверхность площадки проточной кюветы — она должна быть чистой и сухой. Удерживая проточную кювету за края, поставить ее на площадку проточной кюветы.

Осторожно нажать на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой. Когда защелка проточной кюветы закрывается, два центровочных штырька позиционируют проточную кювету. Закрыть дверцу отсека проточной кюветы. Нажать кнопку «Далее».

Открыть дверцу холодильника для реактивов. Придерживая картридж с реактивами за рукоятку, вставить его в холодильник для реактивов до упора. Закрыть дверцу отсека для охлаждения реактивов. Закрыть дверцу отсека с реактивами. Нажать кнопку «Далее».

Загрузив проточную кювету и реактивы, проверить параметры цикла и выполнить предварительную проверку устройства, затем запустить цикл в соответствии с инструкцией на Генетический секвенатор MiSeq.

После окончания анализа на Генетическом секвенаторе MiSeq, результаты будут сохранены в виде файла формата VCF. Для доступа к файлам необходимо открыть папку Alignment на жестком диске MiSeq. Путь к папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data\Intensities\Basecalls\Alignment

Каждый файл, соответствующий результатам анализа отдельного образца имеет имя следующего вида: "SampleName_S#.vcf", где SampleName - это название образца, которое было задано при создании протокола анализа, а знак "#" соответствует порядковому номеру образца в протоколе анализа. Без использования специализированного программного обеспечения открыть файлы следует с помощью текстового редактора по умолчанию: например, "Блокнот"(NotePad) или WordPad.

Для подтверждения заявленных характеристик специфичности в VCF-файле должна присутствовать запись следующего вида, в противном случае характеристики считаются неподтвержденными.

Запись в vcf-файле					ген	мутация
chr17	41209079	rs1217805587	T	TG	BRCA1	5329dup

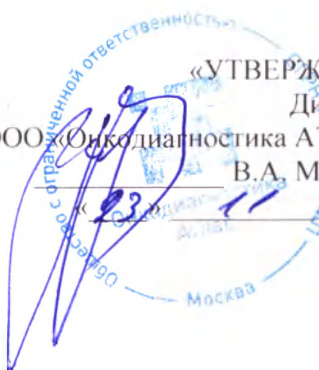
Чувствительность считается подтвержденной, если в обеих повторностях образцов КО и двукратного разведения КО обнаруживается только запись, соответствующая генетическому варианту BRCA1 5329dup и не обнаруживаются другие генетические варианты.





Общество с ограниченной ответственностью
«Онкодиагностика АТЛАС»,
[ООО «Онкодиагностика АТЛАС»]
121069, Россия, Москва, ул. Малая Никитская,
д. 31, стр. 1, эт. 1, помещ. 4.
ИНН: 5408287687, КПП: 773101001, ОГРН: 1115476059401

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
ООО «Онкодиагностика АТЛАС»
В.А. Милейко
« 23 » 2022 г.



**Инструкция по применению
стандартного образца предприятия
Контрольная панель предприятия №1**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Контрольная панель предприятия “КПП ABC плюс” предназначена для контроля аналитической специфичности, правильности определения, предела обнаружения, воспроизводимости и повторяемости набора реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест ABC плюс) по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022.

2. ОПИСАНИЕ

Контрольная панель предприятия “КПП ABC плюс» представляет собой набор из 7 образцов геномной ДНК в TE буфере, содержащих последовательности генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA. Концентрация каждого образца в составе КПП 5 нг/мкл. Состав КПП представлен в Таблице 1.

Названия образца	Ген	Хромосома	Координата генетического варианта	Название генетического варианта	dbSNP / COSMIC ****
Образец №1	BRCA1	chr17	41209079	c.5329dup	rs1217805587
Образец №2	BRCA2	chr13	32914437	c.5946del	rs80359550
Образец №3	ATM	chr11	108175462	c.5557G>A	rs1801516
Образец №4	CHEK2	chr22	29121230	c.573+1G>A	rs121908698
Образец №5	PALB2	chr16	23646274	c.1592del	rs180177102
Образец №6	PIK3CA	chr3	178936082	c.1624G>A	COSV55873227
Образец №7	Отсутствие генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA				

Таблице 1.

Образец №1 содержит мутацию c.5329dup в гене BRCA1 с долей мутантного аллеля 3-5%. Образец №2 содержит мутацию c.5946del в гене BRCA2. Образец №3 содержит мутацию c.5557G>A в гене ATM. Образец №4 содержит мутацию c.573+1G>A в гене CHEK2. Образец №5 содержит мутацию c.1592del в гене PALB2. Образец №6 содержит мутацию c.1624G>A в гене PIK3CA. Образец №7 не содержит генетических вариантов в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA.

Концентрация ДНК определена спектрофотометрически, генотип установлен с помощью секвенирования по Сэнгеру. Образцы не содержат агентов, способных к размножению и являются биологически безопасными.

3. АТТЕСТОВАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Концентрация ДНК (5 нг/мкл) определялась спектрофотометрически с помощью анализатора NanoDrop 2000c (Свидетельство об утверждении типа средств измерений №56026-13).

Генотипы образцов, входящих в состав КПП подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

1. ПЦР-бокс БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" (620.100) (ЗАО "Ламинарные системы", Россия).
2. Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения MiSeq, MiSeqDx (MiSeq) («IlluminaInc.», США).
3. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (Thermo Fisher Scientific Inc., США).
4. Магнитный штатив для 96-луночных планшет DynaMag™-96 Side (Thermo Fisher Scientific Inc., США).
5. Вортекс персональный V-1 plus (SIA «BioSan», Латвия).
6. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Step One, с принадлежностями (Life Technologies Corporation, США).
7. Спектрофотометр UV-1800 с принадлежностями (SHIMADZU CORPORATION, Япония).
8. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research® Plus с принадлежностями (Eppendorf AG, Германия).
9. Салфетки безворсовые Kimwipes (Kimberly-Clark Corporation, США).
10. Пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф, DNA LoBind, PCR clean, бесцветные, (Eppendorf, Германия).
11. Штатив для пробирок 0,5 мл «рабочее место» на 200 лунок.
12. Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 54xx, с принадлежностями (Centrifuge 5403) (Eppendorf AG, Германия).
13. Штатив для стрипов и планшетов, 96 лунок.
14. Штатив «рабочее место» для 96-стрипованных пробирок объемом 0,2 мл.
15. Четырехсторонний штатив для пробирок разного объема (50 мл, 15 мл, 1,5 – 2,0 мл, 0,5 мл).
16. Перчатки нитриловые неопудренные.
17. Спирт этиловый лабораторный, 96%.
18. Холодильная камера, поддерживающая температуру 2-8 °С.
19. Морозильная камера, поддерживающая температуру – 20 – 22 °С.
20. Вода деионизированная бидистиллированная.

5. УСЛОВИЯ И ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ.

Контрольная панель предприятия "КПП ABC плюс" может использоваться для контроля аналитической специфичности, правильности определения, предела обнаружения, воспроизводимости и повторяемости определения генетических вариантов в генах BRCA1, BRCA2, ATM, CHECK2, PALB и PIK3CA самостоятельно.

КПП полностью готова к применению и не требует разведения при использовании с набором реагентов для одновременного выявления генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHECK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования по ТУ 21.20.23-005-91709359-2022. Панель рекомендовано использовать в двух повторностях.

Подготовка и проведение анализа

Для анализа использовать КПП в двух повторностях. Разморозить КПП при комнатной температуре. Встряхнуть на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирок.

Все дальнейшие манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах!

Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на необходимое количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 14 реакций
ПЦР-смесь 1	2 мкл	28 мкл
Раствор праймеров (№1 или №2)	5 мкл	70 мкл
Всего	7 мкл	

Смешать в отдельных пробирках по 3 мкл каждого образца КПП с 7 мкл каждого раствора для амплификации. Общий объем каждой реакционной смеси составит 10 мкл.

Пробирки с образцами плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.

Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации следующим образом:

Количество циклов	Шаг	Т°С	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °С	15 мин
19 циклов	Денатурация	99 °С	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °С	4 мин
1 цикл	Хранение	4°С	∞

Перед выполнением дальнейших манипуляций пробирки с продуктами ПЦР бережно перемешать, не допуская образования пузырей, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

Перемешать содержимое каждой пробирки кратковременным вортексированием, после чего сбросить капли с крышек кратковременным центрифугированием. Объединить продукты ПЦР каждого образца. Для этого последовательно перенести 10 мкл реакционной смеси из каждой пробирки одного стрипа в пробирку второго стрипа того же порядкового номера, соответствующую одному и тому же образцу. Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.

Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР.

Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура, °С	Время	Кол-во циклов
50	10 мин	1
55	10 мин	
73	20 мин	
10	Хранение не более 1 часа	

По окончании выполнения программы извлечь пробирки из реакционного модуля прибора. При необходимости, пробирки можно хранить при температуре не выше минус 20°С.

Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л для лигирования согласно расчету:
(без учета потерь при пипетировании ~10%)

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 14 реакций
ЛС адаптеры	2 мкл	28 мкл
Раствор Л	4 мкл	56 мкл
Всего	6 мкл	84 мкл

Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.

Добавить 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки активатором. Пипетировать 10 раз.

Добавить 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°С	30 минут
72°С	10 минут
10°С	(хранение до 1 часа)

Вынуть пробирки из термоциклера.

Подготовить рабочую смесь Магнитных частиц с деионизованной водой из расчета, как указано в таблице ниже. Тщательно перемешать смесь на вортексе. Рабочая смесь используется только на первом этапе очистки. На втором этапе очистки используются неразведенные Магнитные частицы.

	На 1 реакцию	На 14 реакций
Деионизованная вода	20 мкл	280 мкл
Магнитные частицы	22 мкл	308 мкл

Внести 42 мкл рабочей смеси в каждую пробирку, содержащую библиотеку. Тщательно перемешать содержимое на вортексе и осадить на центрифуге для сбора капель. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Приготовить пустой стрип из набора и аккуратно перенести в него супернатант из каждой пробирку в соответствующую пробирку нового стрипа, не задевая осадок.

В каждую пробирку к супернатанту, полученному ранее добавить 58 мкл неразведенного раствора Agencourt®AMPure®XPREagent. Тщательно перемешать содержимое стрипа на вортексе и осадить на центрифуге для сбора капель. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно удалить супернатант из каждой пробирки, не задевая осадок. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл.

Приготовить свежий 70% этанол, смешав 95% спирт с водой в расчете 2,3 мл 96% этанола на 1,0 мл деионизованной воды.

Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирках.

Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирках.

Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из лунок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц на пробирках. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая из магнитного штатива. Не пересушивать магнитные частицы. После окончания сушки сразу же приступить к следующему шагу.

Добавить в каждую пробирку 48 мкл ПЦР-микс. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы. Добавить по 2 мкл одного Олигонуклеотидного индекса Си и одного Олигонуклеотидного индекса Ли. В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация Олигонуклеотидных индексов — это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Каждому образцу соответствует свой Индекс. Важно зафиксировать соответствие номера образца и Индекса.

Перемешать содержимое на вортексе. Установить пробирки в термоциклер.
Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	95°C	2 минуты
6 циклов	95°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

Тщательно провортексировать Реагент В перед использованием (Реагент В при -20 °C может оставаться в жидком состоянии. Либо может быть частично заморожен. Однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент В до комнатной температуры и тщательно перемешать). Добавить 85 мкл Реагента В в каждую библиотеку, и тщательно вортексировать для того, чтобы полностью перемешать компоненты суспензии. Коротко осадить на центрифуге, чтобы сбросить капли. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

Поместить стрип, на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в лунках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы в лунке.

Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в лунке.

Добавить еще раз по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола, выждать 30 секунд и осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в лунке.

Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из лунок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц на лунках. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая стрип из магнитного штатива. Не пересушивать магнитные частицы.

Удалить стрип с магнитного штатива и добавьте в каждую пробирку 35 мкл ТЕ Буфера для диспергирования магнитных частиц. Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадите на центрифуге для сбора капель.

Поместить стрип на магнитный штатив DynaMag™-96 SideMagnet и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести готовые ДНК библиотеки в новые чистые пробирки, не задевая магнитных частиц.

Неразведенные библиотеки могут храниться на 4-8°C до 1 месяца. Для более длительного хранения поместите библиотеки на -20°C.

Развести библиотеки до концентрации 4000 пмоль/л (эквивалентно 680 нг/мл) используя 15 мкл исходной библиотеки. Смешайте в равных объемах полученные разведенные библиотеки. Одновременно могут быть проанализированы (секвенированы) библиотеки контрольных образцов из варианта исполнения набора Соло-тест.

Извлечь картридж из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C. Поместить картридж с реактивами в водяную баню, содержащую деионизированную воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя

погружать картридж глубже, чем до линии, указанной на его упаковке. Оставить картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания на 60 минут.

Разморозить раствор НТ1 при комнатной температуре, тщательно перемешать и оставить охлаждаться во льду. Приготовить 1 мл свежего раствора 0,2 М NaOH путем смешивания 800 мкл деионизованной воды и 200 мкл 1,0 М NaOH.

Приготовить эквимольную смесь ДНК библиотек (далее «пулированную библиотеку»): разморозить (если была заморожена), тщательно перемешать.

Смешать в чистой пробирке 5 мкл пулированной библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 М NaOH. Тщательно перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре 5 минут. Добавить к смеси 990 мкл охлажденного раствора НТ1. Тщательно перемешать.

Вынуть картридж из водяной бани и осторожно постучать им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытереть основание картриджа насухо. Перевернуть картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно проверить, что все позиции оттаяли, равномерно перемешаны и не содержат осадка.

Осторожно постучать картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактиве. Очистить колпачок из фольги, покрывающий емкость с надписью: “Загрузка образцов” безворсовой лабораторной салфеткой. Проколоть колпачок из фольги чистым наконечником для пипетки на 1 мл.

Внести с помощью пипетки 600 мкл подготовленной пулированной библиотеки в резервуар с пометкой “Загрузка образцов”, не касаясь колпачка из фольги.

Создать новую программу цикла в соответствии с инструкцией к генетическому секвенатору MiSeq, указав соответствующие номера индексов для каждого образца. Надев новую пару неопудренных перчаток, пользуясь пластиковыми щипцами, захватить проточную кювету за основание пластмассового кейса и извлечь ее из емкости.

Слегка промыть проточную кювету водой лабораторного класса, до тех пор, пока стеклянная ячейка и пластиковый кейс не будут тщательно отмыты от избытка солей.

Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах анализа.

Насухо протереть проточную кювету безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой.

Протереть стекло проточной кюветы спиртовой салфеткой. Удостовериться в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки. Не протирать спиртовой салфеткой область прокладки проточной кюветы. Избыток спирта протереть безворсовой салфеткой для очистки оптики.

Удостовериться в том, что в отверстиях проточной кюветы нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы. Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно вернуть ее на место и добиться того, чтобы она надежно располагается вокруг отверстий кюветы. Поднять дверцу отсека проточной кюветы и нажать кнопку справа от защелки проточной кюветы.

Убедиться в том, что на площадке проточной кюветы отсутствует ворс. Если на площадке есть волокна или иные загрязнения, протереть площадку начисто спиртовой салфеткой или безворсовой тканью, смоченной этанолом. Тщательно протереть поверхность площадки проточной кюветы — она должна быть чистой и сухой. Удерживая проточную кювету за края, поставить ее на площадку проточной кюветы.

Осторожно нажать на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой. Когда защелка проточной кюветы закрывается, два

центровочных штырька позиционируют проточную кювету. Закрывают дверцу отсека проточной кюветы. Нажать кнопку «Далее».

Открыть дверцу холодильника для реактивов. Придерживая картридж с реактивами за рукоятку, вставить его в холодильник для реактивов до упора. Закрывают дверцу отсека для охлаждения реактивов. Закрывают дверцу отсека с реактивами. Нажать кнопку «Далее».

Загрузив проточную кювету и реактивы, проверить параметры цикла и выполнить предварительную проверку устройства, затем запустить цикл в соответствии с инструкцией на Генетический секвенатор MiSeq.

После окончания анализа на Генетическом секвенаторе MiSeq, результаты будут сохранены в виде файла формата VCF. Для доступа к файлам необходимо открыть папку Alignment на жестком диске MiSeq. Путь к папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\DataIntensities\Basecalls\Alignment

Каждый файл, соответствующий результатам анализа отдельного образца имеет имя следующего вида: "SampleName_S#.vcf", где SampleName - это название образца, которое было задано при создании протокола анализа, а знак "#" соответствует порядковому номеру образца в протоколе анализа. Без использования специализированного программного обеспечения открыть файлы следует с помощью текстового редактора по умолчанию: например, "Блокнот"(NotePad) или WordPad.

Для подтверждения заявленных характеристик аналитической специфичности, правильности определения, предела обнаружения, воспроизводимости и повторяемости в VCF-файле должны присутствовать записи следующего вида, в противном случае характеристики считаются неподтвержденными.

Запись в vcf-файле					ген	мутация	КО	образцы из КПП						
								1	2	3	4	5	6	7
chr17	41209079	rs1217805587	T	TG	BRCA1	5329dup	+	+	-	-	-	-	-	-
chr13	32914437	rs80359550	GT	G	BRCA2	5946del	-	-	+	-	-	-	-	-
chr11	108175462	rs1801516	G	A	ATM	5557G>A	-	-	-	+	-	-	-	-
chr22	29121230	rs121908698	C	T	CHEK2	573+1G>A	-	-	-	-	+	-	-	-
chr16	23646274	rs180177102	CA	C	PALB2	1592del	-	-	-	-	-	+	-	-
chr3	178936082	COSV55873227	G	A	PIK3CA	1624G>A	-	-	-	-	-	-	+	-

Аналитическая специфичность, правильность определения, предел обнаружения, воспроизводимость и повторяемость считаются подтвержденными, если в обеих повторностях КПП обнаруживаются только записи, соответствующие генетическим вариантам, перечисленным в Таблице 1 и не обнаруживаются другие генетические варианты.

