

**RingCap®**

**Oncology Multi-Gene Mutations Detection Kit-two step**

**High-Throughput Sequencing**

# Manuál (Illumina)

**Název kitu**

Oncology Multi-Gene Mutations Detection Kit (High-Throughput Sequencing)

**Balení**

16 Testů/kit

## Zamýšlené použití

Kit je určen k detekci genových somatických mutací (viz Příloha Tabulka 1, 2) v patologické tkáni, periferní krvi nebo FFPE odebraných pacientům s nemalobuněčným karcinomem plic nebo kolorektálním karcinomem. Výsledky jsou indikovány pouze jako pomoc při individualizované terapii pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic nebo kolorektálním karcinomem. Výsledky nebudou považovány za jediný důkaz, který určuje, zda pacient vyhovuje individualizované terapii. Před komplexním posouzením by měly být také zváženy determinanty, jako je mimo jiné stav pacienta, lékové indikace, terapeutická odpověď a další laboratorní detekční ukazatele.

Souprava umožňuje detekci 482 somatických mutací 13 genů (viz Příloha Tabulka 2), včetně jednobázových mutacíe, inzercí, delecí a genových fúzí [1-8]. Korelace mezi genovými mutacemi a specifickými cílovými léčivy jsou převážně z literatury a jsou obecně uznávány klinickou praxí [5-10].

## Technologický princip

Vysoce výkonné sekvenování, známé také jako sekvenování nové generace (NGS), lze rozdělit na polovodičové sekvenování, sekvenování DNA nanosfér a tak dále podle různých principů sekvenování. NGS umožňuje sekvenování až milionů cílových nukleových kyselin najednou, poskytuje bohaté informace o variantách v krátkém čase a při relativně nízkých nákladech. NGS svým vysokým výkonem a vysokým rozlišením přitahuje stále více pozornosti v mnoha signálních drahách a cílových studiích rakoviny. Proveditelnost detekce více cest/cílů založených na NGS jako pomůcky při diagnostice onemocnění byla podpořena četnými klinickými studiemi (např. Lung-MAP1, CRUK, WIN Consortium a NCI-MATCH) [1-6].

Konstrukce knihovny vzorků se opírá o specifické modifikované primery a amplifikační technologii zprostředkovanou RingCap® s využitím PCR přístrojů. Specifické modifikované primery umožňují přesnou PCR amplifikaci cílových sekvencí, amplifikace zprostředkovaná RingCap® umožňuje terminální modifikaci produktů se specifickými sekvencemi. Kombinací konkrétního PCR programu a Ring-Cap® polymerázy by bylo možné dosáhnout konstrukce cílových sekvencí na běžných PCR přístrojích dříve, než budou připraveny pro vysokokapacitní sekvenování.

## Obsah kitu

Tabulka 1 Obsah kitu

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Č. | Název obsahu | Hlavní obsah | Barva stripu | 16 Testů/Kit | Poznámka |
| Objem | Množství | 8-Tube Strip |
| 1 | **Onco-DNA PCR Strip** | Primer, dNTPs, Mg2+, Buffer | Modrá | 20 µL | 16  | 2 stripy | Každá zkumavka obsahuje stejné činidlo. |
| 2 | **Onco-RNA PCR Strip** | Primer, dNTPs, Mg2+, Buffer | Růžová | 20 µL | 16 tubes | 2 stripy | Každá zkumavka obsahuje stejné činidlo. |
| 3 | **UDI 1-8****Reaction Strip** | UDI primer, dNTPs, Mg2+, Buffer | Fialová | 20 µL | 8 tubes | 1 strip | Každá zkumavky stripu obsahuje jiný UDI. |
| 4 | **UDI 9-16****Reaction Strip** | UDI primer, dNTPs, Mg2+, Buffer | Zelená | 20 µL | 8 tubes | 1 strip | Každá zkumavky stripu obsahuje jiný UDI. |
| 5 | **UDI 17-24****Reaction Strip** | UDI primer, dNTPs, Mg2+, Buffer | Bílá | 20 µL | 8 tubes | 1 strip | Každá zkumavky stripu obsahuje jiný UDI. |
| 6 | **UDI 25-32****Reaction Strip** | UDI primer, dNTPs, Mg2+, Buffer | Žlutá | 20 µL | 8 tubes | 1 strip | Každá zkumavky stripu obsahuje jiný UDI. |
| 7 | **RingCap-Taq****(1#)** | Taq enzyme | —— | 20 µL | 1 tube | —— | —— |
| 8 | **Onco-DNA****Negative Control** | Wild type DNA | —— | 20 µL | 1 tube | —— | —— |
| 9 | **Onco-RNA****Negative Control** | Wild type cDNA | —— | 20 µL | 1 tube | —— | —— |
| 10 | **Onco-DNA****Positive Control** | Mutation type DNA | —— | 20 µL | 1 tube | —— | —— |
| 11 | **Onco-RNA****Positive Control** | Mutation type cDNA | —— | 20 µL | 1 tube | —— | —— |

Poznámka 1: Reakční UDI stripy obsahují různá čísla UDI a různé sekvence UDI (viz příloha Tabulka 5,6). Reagencie byly předem zabaleny do 8-zkumavkových proužků. Levá šikmá poloha víčka stripu je orientována směrem dopředu,



 Obrázek 1. zleva doprava UDI 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Poznámka 2: Obsah různých šarží činidel nelze míchat.

## Další požadované vybavení a materiály

1. Kit pro izolaci nukleopvých kyselin: Nucleic Acid Extraction Kit (FFPE DNA+RNA) (Xiamen Spacegen Co., Ltd, Cat. No. SPGHSDR001R/002R) nebo Nucleic Acid Extraction Kit (Plasma DNA) (Xiamen Spacegen Co., Ltd, Cat. No. SPG-HSPD001R) onebo Nucleic Acid Extraction Kit (Peripheral blood RNA Centrifugal column method) (Xiamen Spacegen Co., Ltd, Cat. No. SPG-HSBR001R)
2. Kit pro reverzní transkripci: Super Script™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11754-050)
3. Kvantifikace nukleových kyselin: Quanti Fluor® dsDNA System (Promega, Cat. No. E2670) nebo Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q32851/Q32854), Qubit® ssDNA Assay Kit (Alternatively) (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q10212)
4. Fluorometr: Quantus™ Fluorometer (Promega, Cat. No. E6150) nebo Qubit™4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q33238)
5. Magnetické kuličky: SG Pure Beads (Xiamen Spacegen Co., Ltd, Cat. No. SPG-PB001R/002R) nebo HighPrep™ PCR (MagBio, Cat. No. AC60005/ AC-60050/ AC-60250/ AC-60500)
6. Sekvenační činidla a následná činidla je třeba zakoupit samostatně: Výběr odpovídajícího sekvenačního činidla podle sekvenátoru
	1. Illumina: PhiX Control V3 (Illumina, Cat. No. FC-110-3001)
	2. MGI: MGIEasy universal library conversion kit (APP-A) (MGI, Cat. No. 1000004155), High throughput sequencing primer kit (App-C) (Alternatively) (MGI, Cat. No. 1000027472)
7. Magnetický stojánek
8. Microvolume UV-visible spectrophotometr
9. Ethanol absolutní (Analytical Grade)
10. TE Buffer (pH 8.0)
11. Nuclease-Free voda
12. Nuclease-Free pipety a špičky s filtrem

## Přeprava, stabilita a skladování

1. Skladovací podmínky: Chraňte kit před světlem při -15℃ až -25℃, poté je stabilní 9 měsíců. Jakmile je otevřen, tak jej skaldujte v originálním obalu při -15℃ až -25℃ až do data expirace uvedené na obalu. Zabraňte opakovanému rozmražování a zmražování. Nepřekračujte maximálně 5 cyklů zmražování a rozmražování.
2. Přepravní podmínky: Kit by měl být přepravován při nízké teplotě, s dobou přepravy kratší než jeden týden a přepravní teplotou nižší než 25 °C.
3. Na štítcích zkontrolujte datum výroby a datum expirace sady.

## Použitelné nástroje

1. PCR cycler pro přípravu knihovny: ABI 9700, ABI 2720, ABI Veriti, ABI Mini Amp, a další.
2. Sekvenátory:
	1. Illumina (Miseq, NextSeq 500/550, Miniseq, atd.)
	2. MGI (MGISEQ-2000, DNBSEQ-G99RS, atd.)

## Materiál vzorku

Kvalita detekovaných nukleových kyselin je kritická. Odebírejte vzorky podle následujících doporučených typů vzorků:

1. Doporučené typy vzorků: FFPE, periferní krev.
2. FFPE vzorky: Doporučuje se vybrat vzorky FFPE, které nebyly skladovány déle než 2 roky a alespoň 30 % odebrané patologické tkáně tvoří nádorové léze, a použít ne méně než 8 kusů 5 μm sekce nebo 5 kusů 10 μm sekce pro extrakci nukleových kyselin.
3. Vzorky periferní krve: Periferní krev by měla být odebírána do cell-free zkumavky na DNA o objemu nejméně 10 ml.

## Experimentální postup

Poznámka: Konstrukce paralelní knihovny **Onco-DNA possitive control** (Onco-DNA PC), **Onco-RNA possitive control** (Onco-RNA PC) a

Doporučuje se použití i **Onco-DNA negative control** (Onco-DNA NTC) a **Onco-RNA negative control** (Onco-RNA NTC) s testovaným vzorkem.

**I. Library Enrichment**

1. Příprava vzorku:
	1. Extrakce nukleových kyselin a kontrola kvality:
		1. K extrakci genomové **DNA** ze vzorků se doporučuje komerční kit pro extrakci nukleových kyselin. Posuďte kvalitu vzorku DNA pomocí mikroobjemového UV-viditelného spektrofotometru, poměr OD260/OD280 by měl být v rozmezí 1.8-2.2, kvantifikujte DNA vzorek pomocí fluorometru, **koncentrace** by měla být **≥ 2 ng/μl**, celkové množství DNA by mělo být ≥10 ng. Jakmile kvalita nebo množství DNA neodpovídá výše uvedeným požadavkům, znovu extrahujte DNA s novým a/nebo větším vstupem. DNA se doporučuje po exktraci okamžitě použít nebo skladovat při teplotě -15 °C až -25 °C po dobu nejvýše 12 měsíců.
		2. K extrakci genomové **RNA** ze vzorků se doporučuje komerční kit pro extrakci nukleových kyselin. Posuďte kvalitu a množství vzorku RNA pomocí mikroobjemového UV-viditelného spektrofotometru, poměr OD260/OD280 by měl být v rozmezí 1,8-2,3, **koncentrace** by měla být **≥20 ng/μl**, celkové množství RNA by mělo být ≥100 ng. Jakmile kvalita nebo množství RNA neodpovídá výše uvedeným požadavkům, znovu extrahujte RNA s novým a/nebo větším vstupem.
		3. Reverzní transkripce se provádí ihned po extrakci RNA. cDNA se doporučuje okamžitě použít nebo skladovat při -15 °C až -25 °C po dobu nejvýše 12 měsíců.
	2. **Vzorek DNA**: Nařeďte vzorek **DNA** na **2 ng/μl** TE pufrem (pH 8.0) dle koncentrace naměřené Fluorometrem (QUBIT). Objem naředěné DNA by měl být **≥5 μl**.
	3. **Vzorek cDNA**: po reverzní transkripci výše uvedeného množství RNA není třeba vzorek znovu měřit. Obejm vzorku cDNA by měl být **≥5 μL**.
2. Příprava reagencií:
	1. Rozmrazte potřebný počet **Onco-DNA PCR Stripů** (Modrý) a **Onco-RNA PCR Stripů** (Růžový), před použitím je krátce stočte a vložte do chlazeného stojánku.
	2. **RingCap-Taq (1#)** krátce stočte a vložte na led.
3. Příprava reakce pro **DNA** vzorek a DNA pozitivní a negativní kontrolu
	1. Napipetujte **0,25 μl** **RingCap-Taq** do každé jamky v **Onco-DNA PCR Stripu** a krátce centrifugujte.
	2. Přidejte **5 μl** vzorku DNA nebo Onco-DNA PC nebo Onco-DNA NTC, lehce zvortexujte a krátce stočte.
4. Příprava reakce pro **cDNA** vzorek a RNA pozitivní a negativní kontrolu
	1. Napipetujte **0,25 μl** **RingCap-Taq** do každé jamky v **Onco-RNA PCR Stripu** a krátce centrifugujte.
	2. Přidejte **5 μl** vzorku cDNA nebo Onco-RNA PC nebo Onco-RNA NTC, lehce zvortexujte a krátce stočte.
5. Vložte PCR reakce do PCR cycleru s následujícím programem, který je dlouhý obvykle 1:25min:

 Tabulka 2. PCR program

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Krok | Teplota | Čas | Počet cyklů |
| Pre-denaturace | 98℃ | 2 minuty | 1 |
| Denaturace | 98℃ | 15 sekund | 15 |
| Annealing | 65℃ | 4 minuty |
| Hold | 4℃ | ∞ | 1 |

Poznámka: Pokračujte v části "Čištění knihoven" nebo skladujte knihovny při teplotě 2 °C až 8 °C do 8 hodin nebo při teplotě -15 °C až -25°C do 24 hodin. Skladování déle než 24 hodin se nedoporučuje.

**II**. **První přečištění knihovny**

Poznámka: Před použitím **vyndejte magnetické kuličky na pokojovou teplotu** (RT) a důkladně je protřepejte, aby se magnetické kuličky rozptýlily. Připravte si čerstvý **70% etanol**.

1. Do PCR knihovny v **Onco-DNA PCR Stripu** přidejte **37.5 µl** (1.5×objem vzorku) magnetických kuliček a propipetujte.
2. Do PCR knihovny v **Onco-RNA PCR Stripu** přidejte **37.5 µl** (1.5×objem vzorku) magnetických kuliček a propipetujte
3. **Inkubujte** **5 minut** při RT.
4. Vložte stripy na **magnetický stojánek** a jakmile se **supernatant** vyčeří, tak jej opatrně **odsajte a vyhoďte**.

Poznámka: Magnetické kuličky obsahují amplifikovanou knihovnu a nesmí být vyhozeny.

1. Přidejte **150 µl 70% ethanolu**, nechte kuličky „proběhnout“ ethanolem tím, že otočíte strip v magnetu 1-2x a poté čirý **supernantant odsajte a vyhoďte**.
2. Přidejte znovu **150 µl 70% ethanolu**, nechte kuličky „proběhnout“ ethanolem tím, že otočíte strip v magnetu 1-2x a poté čirý **supernantant odsajte a vyhoďte.**
3. Stripy krátce stočte, vložte zpět na magnet a malou špičkou odsajte všechen ethanol.
4. **Sušte 5 minut** s otevřenými víčky (**nepřesušte**).
5. Peletu kuliček rozpusťte v **35 μl TE pufru** (pH 8.0) a **inkubujte 5 minut** při RT mimo magnet.
6. Vložte zpět na **magnet na 2 minuty** a poté **odsajte** čirý **supernatant do čistých zkumavek**.
7. Pokračujte následujícím krokem, případně skladujte při -15℃ až -25℃.

**III. Indexová PCR**

Poznámka: Použijte různé UDI pro různé DNA a cDNA vzorky.

1. Příprava reagencií: Rozmrazte **UDI Reaction Strip**. Krátce stočte a vložte na chladící stojánek.
2. **RingCap-Taq** krátce stočte a vlžte do chladící stojánku.
3. Příprava reakce pro **DNA** vzorek
	1. Napipetujte **0,25 μl** **RingCap-Taq** do každé jamky v **UDI Reaction Stripu** a krátce centrifugujte.
	2. Přidejte **5 μl** přečištěného knihovny DNA, lehce zvortexujte a krátce stočte.
4. Příprava reakce pro c**DNA** vzorek
	1. Napipetujte **0,25 μl** **RingCap-Taq** do každé jamky v **UDI Reaction Stripu** a krátce centrifugujte.
	2. Přidejte **5 μl** přečištěného knihovny DNA, lehce zvortexujte a krátce stočte.
5. Vložte PCR reakce do PCR cycleru s následujícím programem, který je dlouhý obvykle 2:05min:

 Tabulka 3. PCR program

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Krok | Teplota | Čas | Počet cyklů |
| Pre-denaturace | 98℃ | 2 minuty | 1 |
| Denaturace | 98℃ | 15 sekund | 25 |
| Annealing | 65℃ | 4 minuty |
| Hold | 4℃ | ∞ | 1 |

Poznámka: Pokračujte v části "Čištění knihoven" nebo skladujte knihovny při teplotě 2 °C až 8 °C do 8 hodin nebo při teplotě -15 °C až -25°C do 24 hodin. Skladování déle než 24 hodin se nedoporučuje.

**IV. Druhé přečištění knihovny**

Poznámka: Před použitím **vyndejte magnetické kuličky na pokojovou teplotu** (RT) a důkladně je protřepejte, aby se magnetické kuličky rozptýlily. Připravte si čerstvý **70% etanol**.

1. Do PCR knihovny v **UDI Reaction Stripu** přidejte **37.5 µl** (1.5×objem vzorku) magnetických kuliček a propipetujte.
2. **Inkubujte** **5 minut** při RT.
3. Vložte stripy na **magnetický stojánek** a jakmile se **supernatant** vyčeří, tak jej opatrně **odsajte a vyhoďte**.

Poznámka: Magnetické kuličky obsahují amplifikovanou knihovnu a nesmí být vyhozeny.

1. Přidejte **150 µl 70% ethanolu**, nechte kuličky „proběhnout“ ethanolem tím, že otočíte strip v magnetu 1-2x a poté čirý **supernantant odsajte a vyhoďte**.
2. Přidejte znovu **150 µl 70% ethanolu**, nechte kuličky „proběhnout“ ethanolem tím, že otočíte strip v magnetu 1-2x a poté čirý **supernantant odsajte a vyhoďte.**
3. Stripy krátce stočte, vložte zpět na magnet a malou špičkou odsajte všechen ethanol.
4. **Sušte 5 minut** s otevřenými víčky (**nepřesušte**).
5. Peletu kuliček rozpusťte v **35 μl TE pufru** (pH 8.0) a **inkubujte 5 minut** při RT mimo magnet.
6. Vložte zpět na **magnet na 2 minuty** a poté **odsajte** čirý **supernatant do čistých zkumavek**.
7. Pokračujte následujícím krokem, případně skladujte při -15℃ až -25℃.
8. **Kvantifikace knihoven**

Zanalyzujte knihovny na Bioanalyzeru nebo Tapestation.

Všechny DNA i cDNA vzorky včetne pozitivních i negativních kontrol by měly mít **fragment o délce 200-300 bp.**

**Koncentrace** měřená na fluorometru by měla být **vyšší než 0.5 ng/µl**.

Poznámka: Naředěné knihovny lze skladovat při -15℃ až -25℃ až 7 dní.Ředěné knihovny neskladujte.

1. **Ředění knihoven, poolovaní a sekvenace**
2. Illumina
	1. Dle koncentrace knihoven změřené na fluorometru spočítejte molární koncentraci:

 **Koncentrace knihovny – fluorometr (ng/μl) × 106**

**Koncentrace knihovny-molární (nM) =**

 **Délka knihovny- bioanalyser (bp) × 650**

* 1. Nařeďte knihovny na 4 nM vodou.
	2. Knihovny **DNA** a **cDNA** poolujte **4:1** (Smíchejte 20 μl DNA knihovny a s 5 μl cDNA knihovny).
	3. Denatutujte a dále řeďte pool dle manuálu k příslušnému sekvenačnímu kitu, který použijete.
	4. Doporučujeme použít 5% Phix Control V3 (např: Pokud je loading volume 600 μL, tak Phix Control V3 by měl být alespoň 30 μl).
	5. Sekvenační run spusťte dle manuálu Illumina.

**VII. Bioinformatická Analýza**

Přeneste získané Fastq fily na server <https://lab.spacegen.top:52816/> , kde bude provedena analýza, quality control, anotace variant a fúzí.

## Analýza dat

1. Výsledky DNA
	1. Standardy kvality: Pro všechny DNA knihovny platí, že cílový **fragment** by měl být dlouhý **200-300 bp**, **On Target je ≥80%**, **Uniformity ≥75%** a **mean depth ≥5000×**.
	2. Kritéria pro pozitivní záchyt mutace jsou: Ve výsledcích variační analýzy,je efektivní hloubka čtení >500×. Pokud je v analýze u vzorku COSMIC ID, je toto místo mutace posouzeno jako pozitivní mutace. V opačném případě je posouzeno jako negativní nebo pod limitem detekce.

Tabulka 4: Výsledky Onco DNA Possitive control

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Gen | Mutace | Amino Acid zápis mutace | COSMIC ID | Typ mutace |
| EGFR | c.2573T>G | p.L858R | COSMIC6224 | Delece |
| KRAS | c.35G>A | p.G12D | COSMIC521 | Bodová mutace |
| BRAF | c.1799T>A | p.V600E | COSMIC476 | Bodová mutace |
| HER2 | c.2324\_2325ins12 | p.A775\_G775insYVMA | COSMIC20959 | Inzerce |

1. Výsledky RNA
	1. Standardy kvality: Pro všechny cDNA knihovny platí, že cílový **fragment** by měl být dlouhý **200-300 bp**. Hodnota “**Total Reads**” alespoň **2 z 5 interních kontrolních genů** (HMBS, TBP, JUN, LRP1 a MRPL13) musí být **≥200×**. To garantuje dostatečnou kvalitu RNA vzorku.
	2. Kritéria pro pozitivní záchyt mutace jsou: Interpretace fúzní mutace poskytovaná touto soupravou je "detekce specifického místa fúze". Sekvenční data získaná z analýzy fúzního přepisu se zaznamenávají ve formátu několika odečtů na cíl, což se liší od jiných analytických platforem. Při interpretaci výsledků je třeba vzít v úvahu úroveň signálu pozadí:
		1. Pokud není vzorek dostatečně pročten z obou stran a fúze tak nalezena na obou vláknech, tak je vyhodnocena jako negativní.
		2. Pokud je vzorek pročten v kladném i záporném směru a celkový počet čtení je menší než 200×, znamená to, že byla detekována fúze v blízkosti signálu pozadí a doporučuje se zvýšit imput RNA do knihovny; Pokud je po opětovné detekci celkový počet odečtů stále nižší než 200× znamená to, že konkrétní místo fúze je negativní nebo nižší než detekční limit.
		3. Pokud je vzorek pročten v kladném i záporném směru, celkové čtení ≥200×, tak je nalezená fúze hodnocena jako pozitivní.

Tabulka 5: Výsledky Onco RNA Possitive control

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Gen |  | Fúze | COSMIC ID | Typ mutace |
| ALK |  | EML4-ALK.E13:A20. | COSMIC463 | Fúze |
| ROS1 |  | SLC34A2-ROS1.S4:R32. | COSMIC1197 | Fúze |

## Interpretace výsledků

1. Pro knihovnu DNA negativní i pozitivní kontrolu platí, že cílový fragment musí mít délku 200-300 bp, On Target ≥80%, Uniformity ≥75% a mean depth ≥5000×. V opačném případě je tento test nevalidní.
2. Pro knihovnu DNA vzorku platí, že že cílový fragment musí mít délku 200-300 bp, všechny amplikony musí být pokryty, On Target ≥80%, Uniformity ≥75% a mean depth ≥5000×. V opačném případě je výsledek detekce mutací nevalidní.
3. Pro knihovnu RNA vzorku, negativní i pozitivní kontrolu platí, že cílový fragment musí mít délku 200-300 bp, hodnota “Total Reads” alespoň 2 z 5 interních kontrolních genů (HMBS, TBP, JUN, LRP1 a MRPL13) musí být ≥200×. V opačném případě je fúzní test nevalidní.
4. Stupeň somatické variace založený na “Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists” společně formulovaný AMP/ASCO/CAP v roce 2017 rozděluje varianty na 4 typy:
	1. Jasný klinický význam: Diagnostický\prognostický marker konkrétního nádoru nebo léků doporučených\schválených v odborných doporučeních.
	2. Potenciální klinický význam: Diagnostický/prognostický marker konkrétního nádoru nebo léků, který má důkazy úrovně A o jiném nádoru v několika malých výzkumech.
	3. Neznámý klinický význam: V běžné populaci a nádorových databázích nebylo zjištěno vyšší výskyt variant, navíc nemá jasné publikované důkazy.
	4. Neškodný nebo může být neškodný klinický význam: Bylo zjištěno, že vyšší výskyt variant v obecné populaci a nejsou publikovány důkazy.

## Omezení kitu

1. U míst mutace, která nejsou zahrnuta v soupravě, nebo u nukleových kyselin extrahovaných ze vzorků jsou skladovány déle, než je požadováno, nesmí být výsledky v pokynech interpretovány.
2. Negativní výsledky nemohou vyloučit mutace. U několika nádorových buněk může negativní výsledek způsobit také nadměrná degradace nebo koncentrace nukleových kyselin pod limitem detekce.
3. Nepřiměřený odběr vzorků, přeprava, zpracování, nesprávný provoz a experimentální prostředí mohou vést k falešně negativním nebo pozitivním výsledkům.
4. Nádorová tkáň (buňky) může mít velkou heterogenitu, různé výsledky testů mohou být získány odběrem vzorků z různých částí.

## Výkonové charakteristiky

1. Sada by měla mít úhledný vzhled, jasné štítky a neměla by prosakovat
2. V rozmrazeném stavu musí být činidla čirá, bez sedimentů.
3. Záporná referenční míra shody je 100 %.
4. Míra shody kladné referenční hodnoty je 100 %.
5. Souprava umožňuje detekci 5 % specifických genových mutací v 10 ng vzorcích DNA tkáně.
6. Souprava umožňuje detekci 20 kopií/μl fúzních mutací ve vzorcích RNA tkáně.

## Upozornění a bezpečnostní opatření

1. Před experimenty si prosím pečlivě přečtěte pokyny.
2. Provádějte experimenty v souladu s laboratorními předpisy za účelem snížení křížové kontaminace produktů nebo činidel. Pokud je to možné, rozdělte experimentální oblasti do různých funkčních zón.
3. Vyvarujte se opakovaného zmrazování a rozmrazování činidel v soupravě. Nepřekračujte maximálně 5 cyklů zmrazení a rozmrazení.
4. Výsledky této soupravy budou ovlivněny zdrojem vzorku, procesem sběru, kvalitou, přepravními podmínkami, předúpravou atd., stejně jako kvalitou extrahovaného materiálu, typy přístrojů, provozním prostředím a omezením současné molekulární biotechnologie. Výše uvedené faktory a proměnné by vedly k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům. Uživatelé si musí být vědomi potenciálních chyb, přesnosti a omezení, které se mohou vyskytnout během procesu detekce.
5. Kvalita nukleových kyselin je zásadní a kontrola kvality DNA by měla být provedena po extrakci, s templátem je pak nutné okamžitě pokračovat v dalších krocích nebo jej správně skladovat při -15 °C až -25 °C. RNA se doporučuje skladovat jako reverzní transkript na cDNA a RNA bez reverzní transkripce se doporučuje skladovat pod -70 °C.
6. Nenahrazujte žádná originální činidla obsažená v soupravě. Nemíchejte činidla s různými šaržemi.
7. Zvláštní pozornost věnujte použití pozitivní kontroly a důrazně se doporučuje použití špiček s filtrem, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům způsobeným kontaminací činidel.
8. Dávejte pozor na kontaminaci. Před použitím pozitivní kontroly se ujistěte, že jsou ostatní vzorky již hotové a užavřené. Vyhraďte prostory pro přípravu reagencií a zpracování vzorků. Pro přípravu reagencií a přidávání templátů používejte vyhrazené pipety a pipetovací špičky.
9. Před experimentem očistěte experimentální prostory s 10% kyselinou chlornou a poté dvakrát opláchněte vodou. Po experimentu sterilizujte prostředí a pipety 10% kyselinou chlornou, 75% etanolem nebo UV zářením.
10. Všechna používaná činidla mají potenciální nebezpečí. Doporučuje se nosit vhodný ochranný oblek a rukavice. Pro první použití této sady můžete absolvovat školení naší technické podpory.
11. Všechny vzorky včetně pozitivní kontroly v soupravě by měly být považovány za potenciální infekční látky, se kterými by se mělo zacházet opatrně.
12. Vyhněte se použití periferních jamek přístroje PCR; Vyprázdněte otvory nebo kolony mezi vzorky, aby se zabránilo křížové kontaminaci.

## Symbols

|  |  |
| --- | --- |
| Symbol | Symbol definition |
|  | Indicates the need for the user to consult the instructions for use. |
|  | Indicates a medical device that is intended to be used as an in vitro diagnostic medical device. |
|  | Indicates the date when the medical device is manufactured. |
|  | Indicates the manufacturer’s batch code so that the batch or lot can be identified. |
|  | Indicates the temperature limitation. |
|  | Indicates the date after which the medical device is not to be used. |
|  | This is the correct upright position of the distribution packages for transport or storage. |
|  | Indicates a medical device should be kept dry. |
|  |  |
|  | Indicates a medical device that needs protection from light sources. |
|  | Indicates the medical device manufacturer. |
|  | Indicates the authorized representative in the European Community/European Union. |
|  | The product meets the basic requirements of European in vitro diagnostic medical devices directive 98/79/EC. |

## References

1. Mork TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med. 2009, 361 (10):

947-57.

1. Gazdar AF. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. N Engl J Med. 2009, 361 (10): 1018-20.
2. Dancey JE. Epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer. Drugs. 2007, 67 (8): 1125-38.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, el al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011, 61 (2): 69-90.
4. Soulières D, Greer W, Magliocco AM, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. Curr Oncol. 2010, 17 Suppl 1: S31-40.
5. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenibin melanoma with BRAFV600E mutation. N Engl J Med.

2011, 364 (26): 2507-16.

1. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010, 11 (8):

753-62.

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 2007, 448 (7153): 561-6.
2. Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a ‘druggable’receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. Expert Rev Anticancer Ther. 2012, 12 (4): 447-56.
3. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. Cancer Cell.

2010, 17 (1): 77-88.

**Lotus NL B.V.**

**Address:Koningin Julianaplein 10, 1e Verd, 2595AA, The Hague, Netherlands. E-mail: peter@lotusnl.com**

**Manufacturer: XIAMEN SPACEGEN CO., LTD.**

**Address: 4th floor, No.2041 Xizhou Road, Tong’an District, Xiamen 361100, P. R. China**

 **Tel: +86 592 7578317 Fax: +86 592 7578319**

**E-mail: spacegen@ispacegen.com**

**Website:** [**http://www.sspacegen.com**](http://www.sspacegen.com)

Příloha Tabulka 1. Informace o detekovaných genech

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Č. | Jméno | Typ | Pokryté exony | Počet mutací |
| 1 | EGFR | DNA | 18,19,20,21 | 102 |
| 2 | KRAS | 2,3,4 | 56 |
| 3 | BRAF | 15 | 41 |
| 4 | PIK3CA | 10,14,21 | 51 |
| 5 | NRAS | 2,3 | 32 |
| 6 | HER2 | 19,20,21 | 16 |
| 7 | MET | 2,14,16,19,20 | 11 |
| 8 | AKT1 | 2 | 1 |
| 9 | c-KIT | 9,11,13,17 | 100 |
| 10 | PDGFRA | 12,18 | 21 |
| 11 | ALK | RNA | Fusion mutation | 21 |
| 12 | RET | Fusion mutation | 15 |
| 13 | ROS1 | Fusion mutation | 15 |

Příloha Tabulka 2. COSM/COSF ID informace o 482 mutacích

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Č. | Gen | Pokryté exony | COSMIC ID |
| 1 | NRAS | 2 | COSM577, COSM576, COSM573, COSM574, COSM575, COSM569, COSM570, COSM571, COSM567, COSM564, COSM565, COSM566, COSM12723, COSM561, COSM562, COSM563, COSM558 |
| 3 | COSM589, COSM585, COSM586, COSM587, COSM30646, COSM33693, COSM582, COSM583, COSM584, COSM12725, COSM579, COSM580, COSM581, COSM12730, COSM28673 |
| 2 | PIK3CA | 10 | COSM759, COSM17442, COSM760, COSM762, COSM249872, COSM125370, COSM27133, COSM763,COSM12458, COSM27155, COSM764, COSM27374, COSM765, COSM6147, COSM766, COSM12459, COSM25041, COSM767, COSM24712 |
| 14 | COSM778, COSM5030972 |
| 21 | COSM12590, COSM771, COSM36285, COSM772, COSM21451, COSM36286, COSM17445, COSM29110,COSM25085, COSM12591, COSM12463, COSM29313, COSM773, COSM94984, COSM94985,COSM27134, COSM12592, COSM25086, COSM27273, COSM27156, COSM774, COSM775, COSM776,COSM94986, COSM94987, COSM24714, COSM36289, COSM12597, COSM777, COSM27158 |
| 3 | PDGFRA | 12 | COSM21973, COSM741, COSM739, COSM28053, COSM12417, COSM12418 |
| 18 | COSM12405, COSM12396, COSM12398, COSM12397, COSM12406, COSM12401, COSM737, COSM12411, COSM736, COSM96892, COSM12408, COSM12400, COSM12407, COSM12402,COSM12399 |
| 4 | c-KIT | 9 | COSM1326, COSM96885 |
| 11 | COSM23418, COSM1204, COSM1205, COSM1210, COSM1330, COSM1211, COSM1213, COSM1221,COSM1216, COSM1219, COSM1220, COSM24748, COSM1217, COSM1218, COSM1223, COSM1332,COSM1227, COSM1226, COSM1229, COSM21978, COSM1233, COSM1232, COSM30551, COSM28637,COSM1235, COSM1234, COSM1239, COSM1238, COSM29015, COSM1241, COSM18896, COSM21976,COSM1243, COSM1245, COSM27069, COSM1251, COSM1247, COSM1248, COSM1250, COSM1249,COSM1255, COSM1252, COSM1253, COSM1254, COSM1256, COSM36293, COSM1257, COSM1260,COSM1333, COSM1258, COSM1264, COSM1265, COSM17946, COSM29442, COSM1270, COSM23560,COSM1273, COSM1275, COSM19029, COSM1277, COSM1334, COSM1285, COSM133754, COSM96888, COSM96883, COSM33966, COSM1289, COSM1290, COSM1293, COSM1294, COSM36305, COSM36313,COSM1297, COSM1299 |
| 13 | COSM1304, COSM25064, COSM12706 |
| 17 | COSM27910, COSM1310, COSM1311, COSM21979, COSM1312, COSM12711, COSM1314, COSM19285, COSM1315, COSM12710, COSM22379, COSM1317, COSM1316, COSM12709, COSM19109, COSM1321, COSM1322, COSM18681, COSM18682, COSM19110, COSM1323 |
| 5 | EGFR | 18 | COSM41905, COSM28508, COSM28511, COSM12988, COSM12371, COSM13009, COSM13427,COSM41603, COSM28601, COSM18441, COSM6252, COSM6253, COSM18425, COSM6239, COSM12373, COSM22992, COSM28510, COSM13979 |
| 19 | COSM13432, COSM53194, COSM13181, COSM13182, COSM27041, COSM17570, COSM26509,COSM26038, COSM28517, COSM6223, COSM13184, COSM6225, COSM12728, COSM133189,COSM12678, COSM12386, COSM12367, COSM12384, COSM23571, COSM12419, COSM6220,COSM24267, COSM6218, COSM12382, COSM12383, COSM6254, COSM6255, COSM133197,COSM12387, COSM26704, COSM6210, COSM12369, COSM12370, COSM13185, COSM133207, COSM96856, COSM13556, COSM29274, COSM6256, COSM6268, COSM85993, COSM12423 |
| 20 | COSM26445, COSM6241, COSM6242, COSM12376, COSM14068, COSM12427, COSM12378,COSM13428, COSM13005, COSM13433, COSM12377, COSM13006, COSM22954, COSM6226,COSM22940, COSM13007, COSM28513, COSM13189, COSM27110, COSM6240, COSM13190, COSM22951, COSM20891, COSM27568, COSM133565, COSM5945664 |
| 21 | COSM12366, COSM26129, COSM6224, COSM12429, COSM12675, COSM12374, COSM6213,COSM14070, COSM13197, COSM28607, COSM53292, COSM33725, COSM28605, COSM13008,COSM13199, COSM26438 |
| 6 | MET | 2 | COSM706 |
| 14 | COSM707 |
| 16 | COSM696, COSM698, COSM703, COSM702, COSM697, COSM701 |
| 19 | COSM699, COSM700, COSM691 |
| 7 | BRAF | 15 | COSM1138, COSM1137, COSM1136, COSM1135, COSM21542, COSM1134, COSM6267, COSM33729,COSM1132, COSM6265, COSM478, COSM1133, COSM475, COSM477, COSM476, COSM6137,COSM18443, COSM249889, COSM473, COSM474, COSM1130, COSM33808, COSM219798,COSM144982, COSM1128, COSM30730, COSM472, COSM26625, COSM21549, COSM1124, COSM471,COSM1125, COSM1126, COSM470, COSM26506, COSM469, COSM468, COSM1123, COSM467,COSM466, COSM27639 |
| 8 | KRAS | 2 | COSM543, COSM12703, COSM20818, COSM542, COSM538, COSM12722, COSM219781, COSM535, COSM536, COSM537, COSM12721, COSM531, COSM87280, COSM532, COSM533, COSM534,COSM527, COSM528, COSM529, COSM12655, COSM523, COSM524, COSM14209, COSM515,COSM519, COSM522, COSM520, COSM521, COSM25081, COSM34144, COSM512, COSM514,COSM516, COSM517, COSM518, COSM87301, COSM511, COSM510, COSM12654, COSM507 |
| 3 | COSM554, COSM555, COSM551, COSM552, COSM553, COSM549, COSM550, COSM87298, COSM28518, COSM547, COSM546, COSM87288, COSM1667043 |
| 4 | COSM19900, COSM19404, COSM19905 |
| 9 | AKT1 | 2 | COSM33765 |
| 10 | HER2 | 19 | COSM683, COSM5029269, COSM14060, COSM51317, COSM13170 |
| 20 | COSM20959, COSM12558, COSM303938, COSM12552, COSM12553, COSM18498, COSM18609,COSM14062, COSM26681, COSM303948 |
| 21 | COSM14065 |
| 11 | ALK | Fusion mutation | COSF463, COSF412, COSF734, COSF465, COSF1376, COSF1063, COSF731, COSF480, COSF1543,COSF491, COSF1366, COSF1367, COSF733, COSF1064, COSF1065, COSF1297, COSF475, COSF413,COSF1545, COSF1542, COSF1540 |
| 12 | ROS1 | Fusion mutation | COSF1201, COSF1295, COSF1251, COSF1203, COSF1266, COSF1279, COSF1260, COSF1197, COSF1268, COSF1270, COSF1274, COSF1198, COSF1261, COSF1672, COSF1280 |
| 13 | RET | Fusion mutation | COSF1272, COSF1492, COSF1233, COSF1512, COSF1610, COSF1254, COSF1235, COSF1263, COSF1256, COSF1242, COSF1504, COSF1510, COSF1514, COSF1482, COSF1341 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Barva stripu | Číslo | i7 Sekvence | i5 Sekvence（NovaSeq, MiSeq） | i5 Sekvence（iSeq, MiniSeq, NextSeq） |
| Fialová | UDI-1 | TGCATAGC | TAGGATTC | GAATCCTA |
| UDI-2 | TCTATGCA | GTCGTTGC | GCAACGAC |
| UDI-3 | GTACGCAT | CCTCGCAT | ATGCGAGG |
| UDI-4 | AGGTCCTG | AGAAGGCG | CGCCTTCT |
| UDI-5 | CATGAGCT | ACGTCAGA | TCTGACGT |
| UDI-6 | AACTCTAG | CATCTGAT | ATCAGATG |
| UDI-7 | CCGGATGC | GTATCACG | CGTGATAC |
| UDI-8 | GTACGATA | TGCAACTA | TAGTTGCA |
| Zelená | UDI-9 | ATTCGATA | ATGGATCG | CGATCCAT |
| UDI-10 | CGTAGTAC | GCTGAATG | CATTCAGC |
| UDI-11 | GAGTACGT | CAACTGGC | GCCAGTTG |
| UDI-12 | TCAGTGCG | TGCAGCAT | ATGCTGCA |
| UDI-13 | CACACAGT | ACGACCAA | TTGGTCGT |
| UDI-14 | GTGCATCG | CATTCGGC | GCCGAATG |
| UDI-15 | TGCGTCAC | GTATGATT | AATCATAC |
| UDI-16 | ACATCGTA | TGCCTTCA | TGAAGGCA |
| Bílá | UDI-17 | CGGAACGA | GCTGGCTT | AAGCCAGC |
| UDI-18 | CCTGGCAC | ATAGAGAC | GTCTCTAT |
| UDI-19 | ATATCGCT | CACATTGA | TCAATGTG |
| UDI-20 | GACAGTTG | TGGTCACG | CGTGACCA |
| UDI-21 | TGCCTATG | ACCTTCGG | CCGAAGGT |
| UDI-22 | GTACCAGT | CGACCATC | GATGGTCG |
| UDI-23 | AATGTGCA | TAGCATCA | TGATGCTA |
| UDI-24 | TCGTATAC | GTTAGGAT | ATCCTAAC |
| Žlutá | UDI-25 | CTGTGTGT | CGTCGTCT | AGACGACG |
| UDI-26 | ACAGCACT | ATCCTAGC | GCTAGGAT |
| UDI-27 | TATCAGTG | GAAGCCTG | CAGGCTTC |
| UDI-28 | GGGTGTTA | TCGAAGTA | TACTTCGA |
| UDI-29 | GTCATCAC | ACCGGTAC | GTACCGGT |
| UDI-30 | GATGTCAG | CATTCAAT | ATTGAATG |
| UDI-31 | TCACAGCA | TGGTAGCA | TGCTACCA |
| UDI-32 | AGCACAGC | GTAATCGG | CCGATTAC |

Příloha Tabulka 3. Sekvence UDI indexů