



RingCap[®]

**Human Endometrial Cancer Molecular Classification
Detection Kit**

Vysokokapacitní sekvenování nové generace

Návod k použití

Název produktu

Human Endometrial Cancer Molecular Classification Detection Kit (High Throughput Sequencing)

Balení

16 Testů/Kit, 32 Testů/Kit

Zamýšlené použití

Tato souprava se používá ke kvalitativní detekci mutačního stavu genů POLE a TP53 ve vzorcích FFPE pacientek s karcinomem endometria a k detekci 34 mikrosatelitových lokusů pro analýzu mikrosatelitní instability pacientek. Výsledky testů slouží pouze k hodnocení molekulárních charakteristik pacientek s karcinomem endometria, aby poskytly klinickou referenci, a neměly by být používány jako jediný základ pro individualizovanou léčbu karcinomu endometria. Lékaři by měli vzít v úvahu stav pacienta, indikace léků, odpověď na léčbu a další indikátory laboratorních testů a další faktory, aby mohli učinit komplexní úsudek o výsledcích testů.

Rakovina endometria je jedním z nejčastějších nádorů ženského reprodukčního systému, s téměř 200 000 novými případy každý rok je třetím běžným gynekologickým zhoubným nádorem vedoucím k úmrtí. Tradiční klasifikace karcinomu endometria nemůže plně odrážet heterogenitu nádoru. Proto existují určitá omezení v predikci prognózy pacientů a účinku léčebné odpovědi. V roce 2013 identifikoval americký Cancer Genome Atlas (TCGA) čtyři nové typy rakoviny endometria integrací genomických rysů: ultra mutovaný POLE, hypermutovaná mikrosatelitní instabilita (MSI-H), nízký počet kopií (CN-L), vysoký počet kopií (CN-H).

POLE ultra mutovaný: POLE je katalytická podjednotka DNA polymerázy ϵ , která se podílí na replikaci a opravě DNA. Mutace v doméně exonukleázy POLE jsou pozorovány u 7 % karcinomů endometria. Tento typ je charakterizován: mutacemi v doméně exonukleázy POLE (exony 9 - 14) a prognóza je lepší než u jiných typů.

Typ hypermutační mikrosatelitní instabilita (MSI-H): MSI je výraznější ve tkáních karcinomu endometria a obvykle předpovídá lepší klinické stádium. Karcinom endometria typu MSI je charakterizován metylací promotoru MLH1 nebo defektními mutacemi v genech souvisejících s opravou neshody DNA (MMR), což povede k mikrosatelitní instabilitě (MSI).

Nízký počet kopií (CN-L): Nízký počet kopií u karcinomu endometria se objevuje u rakoviny endometria ve stupni 1 až 2 a se stabilními mikrosatelity.

Změny nízkého počtu kopií genů jsou obvykle bez mutací POLE a TP53. Nazývá se také nespecifický typ molekulárního podpisu. (NSMP).

Počet kopií vysoký (CN-H): Zahrnuje všechny serózní karcinomy a 1/4 karcinomů endometriózy 3. histologického stupně. Mezi jeho molekulární charakteristiky patří: více změn v počtu kopií genu, většina případů má mutaci TP53 (90%), známou také jako mutace p53, a prognóza je horší než u jiných typů.

Technologické principy

Vysokokapacitní sekvenování, známé také jako sekvenování nové generace (NGS), umožňuje sekvenování až milionů cílových nukleových kyselin najednou, poskytuje bohaté informace o variantách v krátkém čase a za relativně nízké náklady, hraje významnou roli ve výzkumu rakoviny.

Použitím DNA extrahované ze vzorků FFPE je cílový gen amplifikován a obohacen pomocí více specifických PCR primerů. Poté je provedena PCR amplifikace pomocí primerů s indexovými sekvencemi a polymerázy RingCap-Taq pro získání knihovny vzorků. Knihovna se poté sekvenuje prostřednictvím NGS. Konečné informace o genových mutacích a mikrosatelitní instabilitě se získá pomocí bioinformatického analytického softwaru.

Obsah kitu

Tabulka 1. Obsah kitu

Č..	Název obsahu	Součásti	Barva stripu	16 Testů/Kit			32 Testů/Kit			Pozn.
				Objem	Množství	8-Tube Strip	Objem	Množství	8-Tube Strip	
1	EC-1 Reaction Strip	Primer, dNTPs, Mg ²⁺ , PCR buffer	Modrá	20 μL	16 zkumavek	2 Stripy	20 μL	32 zkumavek	4 Stripy	Každá zkumavka obsahuje stejnou reakci
2	EC-2 Reaction Strip	Primer, dNTPs, Mg ²⁺ , PCR buffer	Růžová	20 μL	16 zkumavek	2 Stripy	20 μL	32 zkumavek	4 Stripy	Každá zkumavka obsahuje stejnou reakci
3	Index 1-48 Reaction Strip	Index primer, Mg ²⁺ , dNTPs, PCR buffer	Bílá	20 μL	48 zkumavek	6 Stripů	20 μL	48 zkumavek	6 Stripů	Každá zkumavka obsahuje jeden Index pár
4	Index 49-96 Reaction Strip	Index primer, Mg ²⁺ , dNTPs, PCR buffer	Bílá	—	—	—	20 μL	48 zkumavek	6 Stripů	Každá zkumavka obsahuje jeden Index pár
5	Ring Cap-Taq (1#)	Taq enzyme	—	20 μL	1 zkumavka	—	20 μL	2 zkumavek	—	—
6	EC Negative Control	Wild type cell line DNA	—	50 μL	1 zkumavka	—	50 μL	1 zkumavka	—	—
7	EC Positive Control	DNA se specifickou mutační sekvencí, wild-type cell line DNA	—	50 μL	1 zkumavka	—	50 μL	1 zkumavka	—	—

Poznámka: Obsah různých šarží nelze míchat.

Potřebné vybavení a činidla

- Souprava pro extrakci nukleových kyselin: Doporučuje se použít kit pro extrakci nukleových kyselin (FFPE) od XIAMEN SPACEGEN CO., LTD;
- Fluorescence meter: Doporučuje se používat Qubit™ 3 Fluorometer a Qubit™ 4 Fluorometer od Thermo Fisher Scientific, CAT. No.: Q33216/Q33238 anebo Quantus™ Fluorometer od Promega, CAT. No E6150;
- Soupravy pro kvantifikaci nukleových kyselin: Qubit® dsDNA HS Assay Kit od Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q32851/Q32854; QuantiFluor® dsDNA System od Promega, Cat. No. E2670;
- Sekvenační kity pro Illumina sekvenátory;
- Illumina PhiX Control V3(Illumina), CAT. No.: FC-110-3002;
- Magnetické kuličky pro purifikaci nukleových kyselin: Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter), CAT. No: A63880/A63881/A63882, HighPrep™ PCR beads (Magbio), CAT. No:AC-60100;
- Magnetický stojánek;
- Ostatní reagenty: absolutní ethanol (analytická třída), Low TE solution (10 mM Tris and 0.1 mM EDTA, pH 8.0), voda bez nukleáz;
- Ostatní spotřební materiál: 1.5 mL centrifugační zkumavky, Beznukleázové pipety a špičky;
- Software pro analýzu dat: High throughput sequencing data analysis system (XIAMEN SPACEGEN CO. LTD.).

Přeprava, stabilita a skladování

- Stav skladování. Soupravu skladujte mimo dosah světla -20±5°C, expirace 12 měsíců. Po otevření je souprava stabilní -20±5°C do uvedeného data expirace. Nepoužívejte kit po 5 cyklech zmrazení a rozmrazení;
- Převážní podmínky. Souprava by měla být přepravována v pěnových krabicích s ledovými sáčky, přičemž doba přepravy je kratší než jeden týden a přepravní teplota je nižší než 25°C;
 - Zkontrolujte štítky s datem výroby a datem expirace sady.

Použitelné nástroje

- PCR přístroj pro přípravu knihovny: ABI 9700, ABI 2720, ABI MiniAmp, ABI Veriti.
- Sekvenátory Illumina.

Materiál vzorku

Kvalita testované DNA je kritická. Před extrakcí DNA odeberte vzorky podle následujících doporučených typů vzorků a požadavků:

1. Doporučené typy vzorků: FFPE tkáň;
2. Vzorky FFPE: Ujistěte se, že vzorek obsahuje alespoň 20 % nádorových buněk. Vyberte vzorky FFPE, které nebyly skladovány déle než 2 roky. Pro extrakci DNA použijte alespoň 8 řezů o velikosti 5 μm nebo alespoň 5 řezů o velikosti 10 μm ;
2. K extrakci DNA z výše uvedených vzorků se důrazně doporučují komerční soupravy. Posuďte kvalitu vzorku DNA pomocí ultrafialového spektrofotometru, poměr OD260/OD280 by měl být v rozmezí 1,7 ~ 2,2. Ke stanovení koncentrace DNA použijte fluorometr, koncentrace DNA by měla být >5 ng/ μl a celkové množství DNA by mělo být >50 ng. Jakmile by množství nebo kvalita DNA nebyla dobrá, extrahujte DNA znovu s novými řezy nebo větším množstvím vzorku. Pokračujte ve vytváření knihovny nebo skladujte DNA/cDNA při teplotě -20 ± 5 °C po dobu ne delší než 12 měsíců.

Experimentální postup

Poznámka: Navrhuje se paralelní příprava knihovny spoku s EC pozitivní kontrolou (PC) a EC negativní kontrolou (NTC).

1. Obohacování knihovny

- a) Příprava reagentů: Z mrazáku si vyndejte EC-1 reaction strip (modrý) a EC-2 reaction strip (růžový). Odstříhnete si potřebný počet zkumavek ze stripu. Vyndejte si na led i RingCap-Taq Enzyme (1#);
- b) Rozmrazte EC-1 reaction strip (modrý) a EC-2 reaction strip (růžový) při laboratorní teplotě. Stočte stripy a RingCap-Taq (1#) před použitím.
- c) Příprava DNA; nařeďte extrahovanou DNA na 5 ng/ μL , objem ≥ 10 μL ;
- d) Přidejte 0.25 μL RingCap-Taq(1#) do připravených EC-1 reaction stripů (modré) a EC-2 reaction stripů (růžové), poté krátce stočte;
- e) Opatrně otevřete "EC-1 reaction zkumavky (modré)" a "EC-2 reaction zkumavky (růžové)", přidejte 5 μL vzorků DNA, zavřete zkumavky a stočte. Pozor na tvorbu bublin.
- f) Vložte zkumavky do PCR cycleru a spusťte amplifikační program dle Tabulky 2.

Tabulka 2 PCR amplifikační program

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Pre-denaturace	98 °C	2 min	1
Denaturace	98 °C	15 sek	15
Annealing	65 °C	4 min	
Hold	10 °C	2 min	1

Poznámka: Pokračujte k části "Čištění obohacených reakcí" nebo skladujte při teplotě 2-8 °C do 8 hodin nebo při -20 ± 5 °C do 24 hodin.

Skladování déle než 24 hodin se nedoporučuje.

2. Čištění obohacených produktů

Poznámka: Před použitím umístěte magnetické kuličky na pokojovou teplotu a vortexujte, aby se magnetické kuličky rozptýlily;

Připravte čerstvý 70% ethanol s vodou bez nukleáz.

- g) Smíchejte produkty zkumavek EC-1 a EC-2 a přeneste směs do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml, přidejte 50 μl magnetických kuliček, promíchejte pipetou, aby se suspenze magnetických kuliček důkladně promíchala s produktem;
- h) Inkubujte 5 minut při RTE;
- i) Vložte zkumavky na magnetický stojánek a inkubuje po dobu 2 minut při RT, opatrně odsajte a vyhoďte supernatant, aniž byste narušili magnetické kuličky. **Poznámka: Nevyhazujte prosím magnetické kuličky, které obsahují amplifikovanou knihovnu;**
- j) Přidejte 150 μl čerstvého 70% etanolu do zkumavek na mag. stojánek. Po 5násobném otočení centrifugační zkumavky o 180° ve směru / proti směru hodinových ručiček, inkubujte 2 minuty při RT. Opatrně odsajte a vyhoďte supernatant, aniž byste narušili magnetické kuličky;
- k) Zopakujte promytí ethanolem ještě jednou;
- l) Odstraňte veškerý ethanol ze zkumavky, ponechte zkumavku na magnetu po dobu 5 minut, aby magnetické kuličky uschly na vzduchu (vyhněte se přesušení);

- m) Vyjměte zkumavku z magnetického stojanu, přidejte 30 µl roztoku s nízkým obsahem TE, aby se magnetické kuličky zcela rozpustily. Směs inkubujte 5 minut při RT;
- n) Vložte zkumavku na magnetický stojan na 2 minuty při RT, dokud není roztok čirý, opatrně vyjměte a přeneste supernatant do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml, abyste získali vyčištěný produkt, uskladněte nebo okamžitě pokračujte k dalšímu kroku.
3. Konstrukce knihovny;
- a) Příprava činidla pro ligaci indexu: Vyjměte potřebné Index reaction stripy z mrazáku do stojánku a nechte rozmrazit při RT. RingCap-Taq (1#) vložte na led. Krátce stočte;
- b) Přidejte 0.25 µL of RingCap-Taq (1#) do 5 µL purifikovaného produktu, lehce zvortexujte a krátce stočte;
- c) Opatrně otevřete strip s indexy, přidejte 5 µL templátu z předchozího kroku a uzavřete;
- d) Krátce stočte;
- e) Vložte zkumavky do PCR cycleru a spusťte amplifikační program dle Tabulky 3.

Tabulka 2 PCR amplifikační program pro konstrukci knihovny

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Pre-denaturace	98 °C	2 min	1
Denaturace	98 °C	15sek	25
Annealing	65 °C	4 min	
Hold	10 °C	2 min	1

Poznámka: Pokračujte v části "Čištění knihovny" nebo skladujte produkty při teplotě 2-8 °C po dobu 8 hodin nebo při teplotě -20±5 °C do 24 hodin. Skladování déle než 24 hodin se nedoporučuje.

4. Čištění knihovny

Poznámka: Před použitím umístěte magnetické kuličky na pokojovou teplotu a vortexujte, aby se magnetické kuličky rozptýlily;

Připravte čerstvý 70% ethanol s vodou bez nukleáz.

- a) Produkt indexové reakce se zcela přeneste do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml, přidejte 25 µl magnetických kuliček a promíchejte pipetou;
- b) Směs inkubujte 5 minut při pokojové teplotě;
- c) Vložte zkumavky na magnetický stojánek a inkubujte po dobu 2 minut při RT, opatrně odsajte a vyhodte supernatant, aniž byste narušili magnetické kuličky. **Poznámka: Nevhazujte prosím magnetické kuličky, které obsahují amplifikovanou knihovnu;**
- d) Přidejte 150 µl čerstvě připraveného 70% etanolu do zkumavek na mag. stojánek. Po 5násobném otočení centrifugační zkumavky o 180° ve směru / proti směru hodinových ručiček, inkubujte 2 minuty při RT. Opatrně odsajte a vyhodte supernatant, aniž byste narušili magnetické kuličky;
- e) Zopakujte promytí ethanolem ještě jednou;
- f) Odstraňte veškerý ethanol ze zkumavky, ponechte zkumavku na magnetu po dobu 5 minut, aby magnetické kuličky uschly na vzduchu (vyhněte se přesušení);
- g) Vyjměte zkumavku z magnetického stojanu, přidejte 30 µl roztoku s nízkým obsahem TE, aby se magnetické kuličky zcela rozpustily. Směs inkubujte 5 minut při RT;
- h) Vložte zkumavku na magnetický stojan na 2 minuty při RT, dokud není roztok čirý, opatrně vyjměte a přeneste supernatant do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml, abyste získali vyčištěný produkt, uskladněte nebo okamžitě pokračujte k dalšímu kroku.

5. Kvantifikace, ředění a skladování knihoven

- Kontrola kvality (QC) knihovny vzorků: pro kontrolu kvality fragmentů knihovny se doporučuje bioanalyzátor; pro NTC knihovnu, PC knihovnu a vzorkové knihovny by hlavní fragmenty měly být kolem 250 ~ 350 bp. Pro měření koncentrace knihovny se doporučuje fluorometr. Kvalifikovaná koncentrace by měla být vyšší nebo rovna 1 ng/μl;
- Podle koncentrace knihovny naměřené fluorometrem se k převodu molární koncentrace knihovny použije následující vzorec, délka DNA pro vypočtenou hodnotu je 300 bp;

$$\text{Koncentrace knihoven: nM} = \frac{\text{DNA koncentrace (ng/}\mu\text{L)} \times 10^6}{\text{DNA délka (bp)} \times 650}$$

- Podle převedené molární koncentrace knihovny zřeďte na 4nM vodou bez DNáz a RNáz;
- Neředěnou knihovnu lze skladovat při teplotě -20±5 °C po dobu 7 dnů; Namíchanou zředěnou knihovnu se doporučuje použít okamžitě.

6. Sekvenování

Pro každý vzorek se doporučuje alespoň 0,4 Gb dat. Phix Control V3 se doporučuje počítat s 5 - 15%;

- Sekvenování knihovny provádějte s ohledem na použitý sekvenátor.

7. Analýza dat

- Použijte software Illumina Sequencing Analysis Viewer v1.9.1 k provedení analýzy kvality sekvenčních dat. Kvalita dat Q30 by měla být vyšší než 75 %;
- Nahrajte soubor FastQ na server. Provádějte kontrolu kvality dat, zarovnání sekvencí, analýzu mutací, anotaci mutací a analýzu mikrosatelitních instabilit pomocí softwaru vyvinutého společností XIAMEN SPACEGEN CO. LTD;
- Použijte modul kontroly kvality analytického systému (založený na Trimmomatic v0.36) k odstranění sekvencí primerů a nekvalitních bází v původních datech;
- Zarovnání sekvence: Pomocí modulu sekvenčního zarovnání softwaru (založeného na BWA v0.7.17 a SAMtools v1.9) porovnejte filtrované soubory FastQ s lidským referenčním genomem (verze hg19), generujte soubory BAM a soubory BAI;
- Analýza mutací: Použijte modul detekce mutací analytického systému (založený na PISCES v5.2.9) k detekci bodových mutací a mutací s delecí inzerce v cílové oblasti "SG_EC_target.region_V1.0.bed";
- Anotace mutací: Pomocí modulu anotace variant softwaru (založeného na ANNOVAR v20180426) anotujte identifikované bodové mutace a mutace s delecí inzerce v souladu s pokyny AMP-ASCO-CAP 2017;
- Analýza mikrosatelitní instability: Pomocí modulu analýzy MSI (založeného na SG-MSI v1.2) analyzujte každé místo mikrosatelitu k posouzení stavu instability mikrosatelitů pomocí chí-kvadrát testu porovnávacího distribuci délky čtení v nádoru a normálních vzorcích (výchozí hodnota) a spočítejte MSI-skóre.

Hodnota pozitivního úsudku

- Zobrazení a stažení výsledků analýzy ze softwaru;
- Standardy kontroly kvality dat: cílový poměr sekvenčních dat se doporučuje vyšší než 80 %, zatímco střední hloubka se doporučuje být vyšší než 2000 ×, rovnoměrnost je vyšší než 75 %;
- Pozitivní úsudek: Ve výsledcích analýzy somatických mutací, pokud frekvence mutací není menší než 5 %, je hodnocena jako pozitivní. V opačném případě je posouzena jako negativní nebo je detekce nižší než detekční limit soupravy na základě efektivní hloubky sekvenování není menší než 100 ×;
- Analýza mikrosatelitních instabilit podle MSI-Score k posouzení nestabilního stavu mikrosatelitů;
- Micro satellite stable (MSS): MSI-Score < 0.3;
- Micro satellite instability (High-frequency MSI, MSI-H): MSI-Score ≥ 0.3.

Interpretace výsledků

1. Knihovna DNA vzorku by měla mít silný pás kolem 250 ~ 350 bp po testu kapilární elektroforézy. Uniformita by měla být vyšší než 75 %, zatímco efektivní průměrná hloubka sekvenování by měla být vyšší než 2000 × po vysokokapacitním sekvenování;
2. U knihovny NC (negativní kontrola), pokud je fragment kolem 250 ~ 350 bp, jsou výsledky somatické mutace hodnoceny jako negativní. Není-li mikrosatelit nestabilní místo detekováno, považuje se kontrola kvality knihovny negativní kontroly za kvalifikovanou. V opačném případě může dojít ke kontaminaci DNA;
3. Pokud je u knihovny PC (pozitivní kontrola) fragment přibližně 250 ~ 350 bp, kvalifikované výsledky detekce by měly být v souladu s informacemi v tabulce pozitivních kontrol (tabulka 2 v dodatku). V opačném případě je detekce neplatná.

Omezení kitu

1. Výsledky detekce jsou určeny pouze pro výzkumné účely. U mutačních míst, která nejsou kitem detekována nebo byla DNA extrahovaná ze vzorků FFPE uchovávána déle, než je požadováno, se výsledky neinterpretují;
2. Negativní výsledky nemohou vyloučit mutace. Negativní výsledek může způsobit i příliš málo nádorových buněk, nadměrná degradace nebo koncentrace DNA pod detekčním limitem;
3. Nepřiměřený odběr vzorků, přeprava, zpracování, nesprávná obsluha a experimentální prostředí mohou vést k falešně negativním nebo pozitivním výsledkům;
4. Nádorové tkáně (buňky) mohou mít velkou heterogenitu, různé výsledky testů mohou být získány odběrem různých částí.

Fyzická výkonnost













1. Souprava by měla mít úhledný vzhled, jasné štítky a bez úniku. V nezmraženém stavu musí být činidla čirá, bez usazenin;
2. Bylo testováno 24 kopií pozitivních referenčních produktů podniku, 16 národních pozitivních referenčních produktů bylo testováno na mikrosatelitní instabilitu (MSI) a míra shody pozitivních referenčních produktů byla 100 %;
3. V detekčním rozsahu je 8 kopií negativních referenčních a stabilních mikrosatelitů a byly testovány 3 národní negativní referenční produkty s mikrosatelitní instabilitou (MSI). Míra koincidence negativních referenčních produktů byla 100 %;
4. Kit detekuje genové mutace již od 5 % ve vzorku DNA o hmotnosti 25 ng;
5. Detekční limit mikrosatelitové nestability je 5 % obsahu DNA nádorových buněk;
6. 2 kopie pozitivní opakovatelné reference, která byla testována 10krát a výsledky testů byly všechny odpovídající jak typu mutací tak i mikrosatelitní instabilitou; Byla testována 1 kopie negativní reference, která se opakovala 10krát, výsledky byly: všechny mutace negativní a mikrosatelity stabilní;
7. Pokud koncentrace hemoglobinu, parafinu, formalínu a ethanolu zbývajících ve vzorku nukleové kyseliny není vyšší než 2 g/l, 1%V/V, 0,005 % obj./v, 1 % obj./v, výsledky nebudou ovlivněny.

Bezpečnostní opatření a varování

1. Před experimentováním si prosím pečlivě přečtěte tento návod;
2. Provádějte experimenty v souladu s laboratorními předpisy, aby se snížila křížová kontaminace produktů nebo činidel; pokud možno oddělte oblasti experimentu na různé funkční zóny;
3. Před experimentem očistěte experimentální prostory 10% kyselinou chlornou a poté opláchněte vodou. Sterilizujte prostředí a pipety 10% kyselinou chlornou, 75% ethanolem nebo UV zářením;
4. Vyhněte se používání krajních jamek PCR cycleru; udržujte prostor mezi vzorky, aby se zabránilo křížové kontaminaci;
5. Výsledky testování mohou být ovlivněny zdroji vzorků, procesem odběru vzorků, kvalitou vzorku, podmínkami přepravy, manipulací se vzorkem atd.; také to může být omezeno kvalitou DNA, typy přístrojů, provozním prostředím a omezením současné molekulární biotechnologie, což vše může vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům. Uživatelé by měli být důkladně informováni o možných chybách a omezení přesnosti;
6. Vyhněte se zbytečnému zmrazování a rozmrazování činidel, činidla by neměla podstoupit více než 5 cyklů zmrazování a rozmrazování;
7. Na kvalitě DNA do značné míry záleží kvalita experimentálních výsledcích, proto co nejdříve přejděte k dalšímu kroku nebo po dokončení extrakce skladujte při doporučené teplotě;
8. Nenahrazujte žádné originální činidla obsažená v soupravě. Nemíchejte činidla různých šarží;
9. Důrazně se doporučuje použití filtrovaných špiček, aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům způsobeným kontaminací činidlem;
10. Dávejte si pozor na kontaminaci vnější DNA; Používejte specifické pipety a špičky pro přípravu reagentů a přidávání templátů. Oblast přípravy činidla by měla být oddělena od oblasti přidávání templátu;

11. Všechna používaná činidla jsou potenciálně nebezpečná. Tuto soupravu mohou používat pouze osoby, které mají pracovní povolení pro laboratoře PCR. Při prvním použití této sady můžete absolvovat školení od naší technické podpory. Veškerý použitý obsah soupravy by měl být považován za infekční odpad a měl by být řádně zlikvidován;
12. Všechny vzorky včetně pozitivní kontroly v soupravě by měly být považovány za potenciální infekční látky. Mělo by se s nimi zacházet opatrně.

Poznámky

Symbol	Legenda
	Označuje, že je nutné, aby si uživatel prostudoval návod k použití.
	Označuje zdravotnický prostředek, který je určen k použití jako diagnostický zdravotnický prostředek in vitro.
	Označuje datum, kdy byl zdravotnický prostředek vyroben.
	Označuje kód šarže výrobce, aby bylo možné šarži nebo šarži identifikovat.
	Označuje teplotní limity, kterým lze zdravotnický prostředek bezpečně vystavit.
	Označuje datum, po kterém se zdravotnický prostředek nesmí používat.
	To je správná vzpřímená poloha distribučních obalů pro přepravu nebo skladování.
	Označuje zdravotnický prostředek, který je třeba chránit před vlhkostí.
	Označuje zdravotnický prostředek, který potřebuje ochranu před světelnými zdroji.
	Označuje výrobce zdravotnického prostředku.
	Označuje zplnomocněného zástupce v Evropském společenství/Evropské unii.
	Výrobek splňuje základní požadavky evropské směrnice o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro 98/79/ES.

Reference

1. Gynecological Oncology Committee of China Anti-Cancer Association. Guidelines for the diagnosis and treatment of endometrial cancer (2021 edition) [J]. China Oncology, 2021, 31(06): 501-512. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.06.08.
2. Chinese Anti-Cancer Association Gynecological Oncology Professional Committee, Chinese Medical Association Pathology Branch, National Pathology Quality Control Center. Chinese Expert Consensus on Molecular Detection of Endometrial Cancer (2021 Edition)[J].China Oncology,2021,31(11): 1126-1144.
3. Uterine Neoplasms. NCCN Guidelines Version 1.2020
4. Urlick M E , Bell D W . Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer[J]. Nature Reviews Cancer.
5. Hoang L N , Mcconechy M K , Meng B , et al. Targeted mutation analysis of endometrial clear cell carcinoma[J]. Histopathology, 2015, 66(5):664-674.

6. Church D N , Ellen S , Nout R A , et al. Prognostic Significance of POLE Proofreading Mutations in Endometrial Cancer[J]. Journal of the National Cancer Institute(1):402.
7. León-Castillo, A., Britton, H., McConechy, M K., et al. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma[J]. The Journal of Pathology, 2020, 250.
8. Gad Getz, Stacey B. Gabriel, Kristian Cibulskis, Eric Lander, Andrey Sivachenko, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma[J]. Nature, 2013, 497(7447):67-73, A3
9. Talhouk A , Mcconechy M K , Leung S , et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers[J]. British Journal of Cancer, 2015, 113(2):299-310.
10. Talhouk A , Hoang L N , Mcconechy M K , et al. Molecular classification of endometrial carcinoma on diagnostic specimens is highly concordant with final hysterectomy: Earlier prognostic information to guide treatment[J]. Gynecologic Oncology, 2016:46-53.
11. Talhouk A, McAlpine J N. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care[J]. Gynecologic oncology research and practice, 2016, 3(1): 14.
12. Stelloo E, Nout R A, Osse E M, et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer—combined analysis of the PORTEC cohorts[J]. Clinical cancer research, 2016, 22(16): 4215-4224.

┌ ───────────┐
└ ───────────┘

Lotus NL B.V.
Adresa: Koningin Julianaplein 10, 1e Verd, 2595AA, The Hague, Netherlands.
E-mail: peter@lotusnl.com



┌ ───────────┐
└ ───────────┘

Výrobce: XIAMEN SPACEGEN CO., LTD.
Adresa: 4th floor, No.2041 Xizhou Road, Xike Town, Tong'an District,
Xiamen 361100, P. R. China
Tel: +86 592 7578317 Fax: +86 592 7578319
E-mail: spacegen@ispacegen.com
Web: <http://www.sspacegen.com>



Příložená tabulka 1
Detekční rozsah kitu

Gen/Položka	Detekční rozsah
TP53	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
POLE	Exony 9-14 a spojení exonu-intronu
MLH1	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
MSH2	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
MSH6	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
PMS2	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
EPCAM	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
PTEN	Kompletní kódující region (CDS) a spojení exonu-intronu
CTNNB1	Exony 3
KRAS	Exony 2-4
PIK3CA	Exony 10, 14, 21
MSI	34 mikro satelitní lokusy

Příložená tabulka 2
Informace o pozitivní kontrole tohoto kitu

Informace o variantách systému				
Název genu	Základní mutace	Aminokyselinová mutace	Cosmic ID	Typ mutace
POLE	c.1366G > C	p.A456P	937318	Bodová mutace
MSH6	c.3261del	p.F1088Sfs*2	330655	Delece
MLH1	c.1513del	p.S505Vfs*3	26802	Delece
PTEN	c.464A>G	p.Y155C	5144	Delece
PTEN	c.955_958del	p.T319*	4898	Delece
TP53	c.377A > G	p.Y126C	11517	Bodová mutace
TP53	c.267_268insC	p.S90Lfs*59	131024	Inzerce
Mikro satelitní instabilita: MSI-H				