

Руководство пользователя

HELICON® ABC Плюс

Набор реагентов для целевого обогащения и приготовления библиотек ДНК с последующим одновременным выявлением генетических вариантов в генах BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии и наследственными опухолевыми синдромами, у пациентов с раком молочной железы, раком яичника, раком предстательной железы, раком поджелудочной железы, а также опухолями невыявленной первичной локализации

по ТУ 21.20.23-006-91709359-2023

Содержание

Описание и назначение	3
Состав набора	4
Принцип действия набора	6
Характеристики набора	13
Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор	14
Анализируемые образцы и пробоподготовка	16
Экстракция ДНК из исследуемых образцов	17
Общие правила и рекомендации для работы с набором	18

Протокол проведения анализа

I Проведение целевого обогащения ДНК	21
II Приготовление библиотек ДНК	23
1 Удаление праймеров из ПЦР продуктов	23
2 Лигирование адаптеров к ампликонам	24
3 Первый этап очистки библиотек	25
4 Второй этап очистки библиотек	26
5 Преамплификация библиотеки	27
6 Очистка преамплифицированной библиотеки	29
7 Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения	30
III Циркуляризация библиотек	31
IV Подготовка образцов к секвенированию и секвенирование	35
V Анализ данных и интерпретация результатов	36
VI Транспортировка и хранение	69

Описание и назначение

Набор «HELICON® ABC Плюс» предназначен для целевого обогащения и приготовления библиотек ДНК с последующим одновременным выявлением генетических вариантов в генах BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, в образцах ДНК человека, выделенной из операционного или биопсийного материала, фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки), плазмы крови, а также из цельной крови, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии и наследственными опухолевыми синдромами, у пациентов с раком молочной железы, раком яичника, раком предстательной железы, раком поджелудочной железы, а также опухолями невыявленной первичной локализации методом высокопроизводительного секвенирования на генетическом секвенаторе «Секвенатор генетический HELICON®» (РЗН 2023/20825 от 16.08.2023) производства ООО «Ухань ЭмДжиАй Тех Ко., Лтд.»

Требования к эксплуатации набора

Для анализа данных, полученных с помощью набора, должно применяться программное обеспечение «Solo AVES» <https://aves.oncoatlas.ru/>, версия 1.03.04 от 04.02.2023 (далее - ПО «Solo AVES»), входящее в состав набора.

Применение набора по назначению возможно только при наличии доступа к сети интернет со скоростью загрузки не менее 1 Mbps и скоростью отдачи не менее 10 Mbps (для анализа данных на ПО «Solo AVES»).

До начала работы следует выполнить тестовый вход в систему по ссылке <https://aves.oncoatlas.ru/> с парой логин/пароль, которая предоставляется ООО «ОНКОАТЛАС»: при переходе по ссылке должна открыться стартовая страница авторизации в личном кабинете пользователя, куда необходимо ввести логин и пароль в соответствующих полях, затем нажать кнопку «Войти». При корректной авторизации осуществляется переход в личный кабинет пользователя. Необходимо убедиться, что на главной странице личного кабинета есть кнопка «Запустить анализ данных» и вкладки «Образцы», «Анализ данных». В случае отсутствия данных элементов следует обновить страницу нажатием комбинации клавиш Ctrl+F5. При неудачной попытке тестового входа необходимо связаться с производителем набора реагентов по электронной почте it-solo@oncoatlas.ru.

При анализе библиотек ДНК, приготовленных с помощью набора из ДНК, выделенной из цельной крови и плазмы крови, а также из операционного или биопсийного материала, фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE блоки), рекомендованная глубина покрытия составляет не менее 5000x.

Показанием к применению набора является проведение целевого обогащения и приготовления библиотек ДНК для дальнейшего одновременного выявления носительства (отсутствия носительства) генетических вариантов в целевых регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA у пациентов с раком молочной железы, раком яичника, раком предстательной железы, раком поджелудочной железы, а также опухолями невыявленной первичной локализации.

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

Состав набора

Набор «HELICON® ABC Плюс» рассчитан на проведение анализа 48 образцов (включая контрольный образец).













Набор выпускается в четырех вариантах исполнения: «HELICON® ABC Плюс А», «HELICON® ABC Плюс Б», «HELICON® ABC Плюс С-А» и «HELICON® ABC Плюс С-Б». Варианты исполнения «HELICON® ABC Плюс С-А» и «HELICON® ABC Плюс С-Б» включают компоненты для целевого обогащения ДНК, приготовления библиотек и циркуляризации библиотек, а варианты исполнения «HELICON® ABC Плюс А» и «HELICON® ABC Плюс Б» включают компоненты для целевого обогащения ДНК и приготовления библиотек. Варианты исполнения «HELICON® ABC Плюс А» может быть использован совместно с вариантом исполнения «HELICON® ABC Плюс С-Б», а «HELICON® ABC Плюс С-А» совместно с «HELICON® ABC Плюс Б» при необходимости анализа до 96 образцов. Допускается объединять библиотеки ДНК, приготовленные с помощью разных наборов при условии, что в одном цикле секвенирования каждый уникальный адаптер будет встречаться только 1 раз. Таким образом, в одном цикле секвенирования может быть объединено до 96 уникальных образцов, включая контроли.

Варианты исполнения «HELICON® ABC Плюс А» и «HELICON® ABC Плюс Б» отличаются только наборами адаптеров, аналогично «HELICON® ABC Плюс С-А» и «HELICON® ABC Плюс С-Б» различаются наборами адаптеров. 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 «HELICON® ABC Плюс А» и «HELICON® 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 «HELICON® ABC Плюс С-А» и «HELICON® ABC Плюс С-Б» включают три комплекта: Комплект для целевого обогащения ДНК (необходимо хранить в пре-ПЦР зоне), Комплект для приготовления библиотек (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне) и Комплект для циркуляризации библиотек (необходимо хранить в пост-ПЦР зоне).

Таблица 1. Состав набора «HELICON® ABC Плюс»

Наименование компонента	Цвет вкладыша на крышке	Объем	Хранение
Комплект для целевого обогащения ДНК			
ПЦР-смесь 1	 Красный	192 мкл	От -22 до -20°C
Раствор праймеров 1	 Желтый	240 мкл	От -22 до -20°C
Раствор праймеров 2	 Желтый	240 мкл	От -22 до -20°C
КО	 Черный	24 мкл	От -22 до -20°C
Комплект для приготовления библиотек ДНК			
Реагент В	 Белая круглая этикетка с символом В	4 500 мкл	От -22 до -20°C
ТЕ буфер	 Белая круглая этикетка с символом ТЕ	4 500 мкл	От -22 до -20°C
ПЦР-смесь 2	 Черный	2 пробирки × 1 152 мкл	От -22 до -20°C
Активатор	 Зеленый	96 мкл	От -22 до -20°C
Раствор Л	 Желтый	192 мкл	От -22 до -20°C
ДНК-лигаза	 Синий	96 мкл	От -22 до -20°C
Адаптеры	 Плашка на 48 лунок с прозрачной пленкой	48 лунок × 2 мкл	От -22 до -20°C
Магнитные частицы	 Нет вкладыша	3 840 мкл	От -22 до -20°C*
Раствор праймеров 3	 Фиолетовый	192 мкл	От -22 до -20°C

* Магнитные частицы должны храниться при температуре от -22 до -20°C до первого вскрытия – после него при температуре 2-8°C.

Комплект для циркуляризации библиотек

Сплинт буфер	 Прозрачный	46,5 мкл	От -22 до -20°C
ДНК-лигаза Ц	 Желтый	2,0 мкл	От -22 до -20°C
Буфер для расщепления	 Синий	5,75 мкл	От -22 до -20°C
Расщепляющий фермент	 Зеленый	10,5 мкл	От -22 до -20°C
Стоп-буфер	 Красный	30 мкл	От -22 до -20°C
Частицы для очистки ДНК	 Черный	800 мкл	От -22 до -20°C
TE буфер Ц	 Фиолетовый	400 мкл	От -22 до -20°C

ПО «Solo AVES» <https://aves.oncoatlas.ru/>, версия 1.03.04 от 04.02.2023.

Принцип действия набора

Набор предназначен для целевого обогащения и приготовления библиотек ДНК с последующим одновременным выявлением генетических вариантов в генах BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA. В основе работы набора лежит амплификация целевых участков ДНК методом мультиплексной ПЦР.

Процесс состоит из 5 этапов: четырех этапов приготовления ДНК библиотек и этапа подготовки ДНК-наношариков и секвенирования с использованием секвенатора «Секвенатор генетический HELICON®» (РЗН 2023/20825 от 16.08.2023) производства ООО «Ухань ЭмДжиАй Тех Ко., Лтд.»

1 этап

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

2 этап

Удаление праймеров с концевых участков ПЦР продуктов и лигирование к ним олигонуклеотидных адаптеров с уникальными индексными последовательностями (баркодами), необходимых для последующего секвенирования библиотеки, и позволяющими атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования. Очистка библиотек на магнитных частицах.

3 этап

Вторичная амплификация и очистка библиотек. Позволяет наработать необходимое количество библиотеки.

4 этап

Циркуляризация библиотек. К пулу библиотек ДНК вводится олигонуклеотид, комплементарный участкам адаптеров, и лигаза. Добавление такого олигонуклеотида делает возможным циркуляризацию исходных фрагментов ДНК. Последующая обработка библиотек расщепляющим ферментом очищает библиотеки от остатков линейных библиотек.

5 этап

Подготовка ДНК-наношариков и секвенирование. Во время подготовки образцов к секвенированию олигонуклеотид служит затравкой при амплификации по типу катящегося кольца – амплификации с множественным вытеснением цепи (Rolling Circle amplification, RCA). Амплификацию проводят до тех пор, пока количество копий исходной матрицы не достигнет 300-500. Благодаря структуре олигонуклеотидов и адаптеров длинная цепь ДНК укладывается в компактную структуру, так называемый наношарик (DNA nanoball, DNB). Полученную библиотеку фрагментов ДНК в виде наношариков наносят на специальную проточную ячейку. Проточная ячейка несет заряженные участки, к которым за счет электростатических сил присоединяются наношарики. Расстояние между заряженными участками рассчитаны таким образом, что к каждому участку присоединяется один наношарик.

Во время секвенирования (на секвенаторе «Секвенатор генетический HELICON®» (P3H 2023/20825 от 16.08.2023) производства ООО «Ухань ЭмДжиАй Тех Ко., Лтд.») к наношарику добавляется праймер для секвенирования (Ancoг — якорная последовательность, якорь). Он присоединяется к адаптерной последовательности ДНК-наношарика. Далее в реакцию добавляется 4 вида нуклеотидов, каждый из которых мечен индивидуальным флуоресцентным красителем. Нуклеотид присоединяется

комплементарно к синтезируемой последовательности ДНК. После его присоединения лишние неспецифичные нуклеотиды удаляются из реакции. Флуоресцентная метка на присоединившемся нуклеотиде возбуждается лазером и сигнал детектируется CCD-камерой. После детекции флуоресцентная метка отщепляется, и проточная ячейка промывается. При повторении циклов присоединения нуклеотида и детекции сигнала происходит секвенирование исходной цепи ДНК.

Анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется с помощью программного обеспечения ООО «ОНКОАТЛАС» «Solo AVES» <https://aves.oncoatlas.ru/>, версия 1.03.04 от 04.02.2023 (далее ПО - «Solo AVES»), входящего в состав Набора. ПО «Solo AVES» одновременно анализирует генетические варианты всех целевых регионов.

Класс потенциального риска применения ПО «Solo AVES» – 26.

Класс безопасности ПО «Solo AVES» – А.

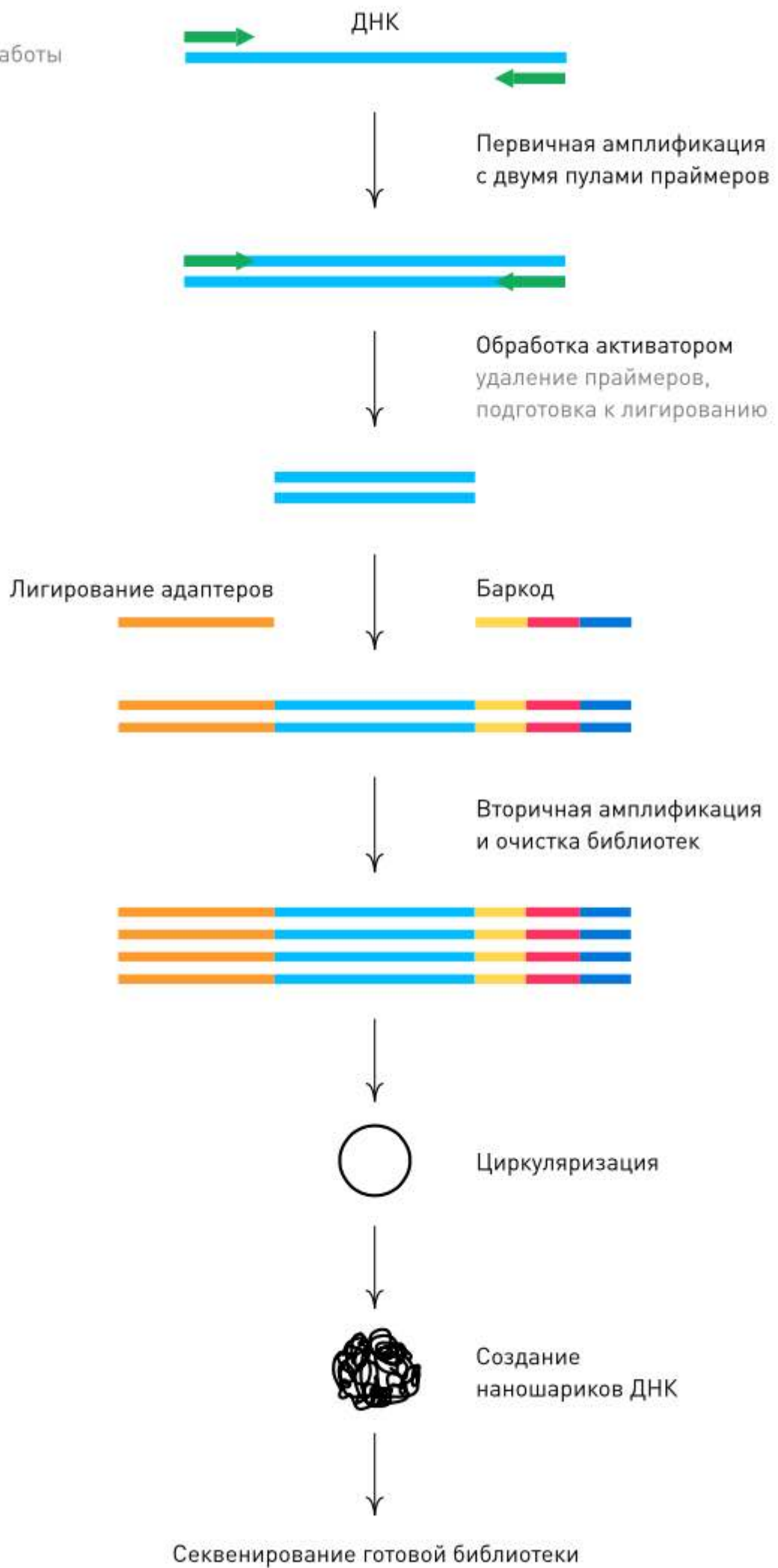
В Наборе имеются три комплекта, необходимые для проведения первых четырех этапов.

Для подготовки библиотек к секвенированию ДНК и проведению секвенирования библиотек образцов на приборе «Секвенатор генетический HELICON® секвенирования нового поколения» (в варианте исполнения: Секвенатор генетический HELICON® G50, в составе) (РЗН 2023/21588 от 28.11.2023) необходимо использовать соответствующие комплекты из состава наборов «Набор реагентов MGI G50 для высокопроизводительного секвенирования, в вариантах исполнения» и действовать согласно инструкции производителя. Варианты исполнения, совместимые с Набором реагентов «HELICON® ABC Плюс»: Набор реагентов G50 SM FCL PE100 для высокопроизводительного секвенирования; Набор реагентов G50 SM FCL PE150 для высокопроизводительного секвенирования; Набор реагентов G50 SM FCS PE100 для высокопроизводительного секвенирования; Набор реагентов G50 SM FCS PE150 для высокопроизводительного секвенирования.

Для подготовки библиотек к секвенированию ДНК и проведению секвенирования библиотек образцов на приборе «Секвенатор генетический HELICON® секвенирования нового поколения» (в вариантах исполнения: Секвенатор генетический HELICON® G400, в составе) (РЗН 2023/21587 от 29.11.2023) необходимо использовать соответствующие комплекты из состава наборов «Набор реагентов MGI G400 для высокопроизводительного секвенирования, в вариантах исполнения» и действовать согласно инструкции производителя. Варианты исполнения, совместимые с Набором реагентов «HELICON® ABC Плюс»: Набор реагентов G400 SM FCL PE100 для высокопроизводительного секвенирования; Набор реагентов G400 SM FCL PE150 для высокопроизводительного секвенирования.

Принцип работы набора проиллюстрирован на рисунке 1.

Рисунок 1.
Принцип работы
набора







Набор включает следующие комплекты

Комплект для целевого обогащения ДНК

Комплект для целевого обогащения ДНК необходим для обогащения фрагментами ДНК, содержащими исследуемые регионы генов. 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»), содержащий генетический вариант chr17:41209079T>TG. Контрольный образец содержит один обозначенный контрольный генетический вариант в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA и позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования. 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, содержащий генетический вариант chr17:41209079T>TG. Он позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования

Комплект для приготовления библиотек

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

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 концевых участков к лигированию с помощью «Активатора». Далее проводится лигирование адаптеров, несущих индивидуальный уникальный баркод (Адаптеры 1-128, в зависимости от варианта исполнения) 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 продуктов ПЦР (пробирки «ПЦР-смесь 2», «Раствор праймеров 3»). Введение баркодов позволяет проводить одновременное секвенирование до 96 образцов за один запуск прибора. Далее проводится очистка полученного продукта ПЦР на Магнитных частицах с использованием «Магнитных частиц», «Реагента В» и «ТЕ буфера». Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек приводится в таблице 3.

Таблица 3. Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек

Название	Описание
 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 адаптеров
 ДНК-лигаза	Лигирует («пришивает») баркодированные адаптеры к наработанным в результате первичной амплификации фрагментам ДНК
 Раствор праймеров 3	Смесь коротких одноцепочечных олигонуклеотидов, необходимых для вторичной амплификации библиотек
 Магнитные частицы	Необходимы для очистки целевых фрагментов ДНК (от адаптеров и праймеров)
 Реагент В	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от свободных праймеров
 ТЕ буфер	Необходим для элюции фрагментов ДНК после очистки на Магнитных частицах от свободных праймеров
 ПЦР-смесь 2	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения вторичной амплификации ДНК

○ Адаптеры

Двухцепочечные олигонуклеотиды, необходимые для проведения вторичной амплификации, для проведения секвенирования, а также для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца, что позволяет атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования

Комплект для циркуляризации

Комплект для циркуляризации необходим для циркуляризации библиотек, полученных с помощью Комплекта для приготовления библиотек.

Очищенные линейные библиотеки циркуляризируются с помощью «Сплинт буфера» и «ДНК-лигазы Ц», не вступившие в реакцию линейные библиотеки расщепляются под действием «Буфера для расщепления» и «Расщепляющего фермента», реакция останавливается после введения «Стоп-буфера». Далее проводится очистка циркуляризованных библиотек на Магнитных частицах с использованием «Частиц для очистки ДНК» и «TE буфера Ц». Описание компонентов Комплекта для циркуляризации приводится в таблице 4.

Таблица 4. Описание компонентов Комплекта для циркуляризации

Название	Описание
○ Сплинт буфер	Обеспечивает работу ДНК-лигазы Ц, содержит олигонуклеотиды для циркуляризации библиотек
● ДНК-лигаза Ц	Лигирует («пришивает») олигонуклеотиды к концевым участкам библиотек
● Буфер для расщепления	Буфер, в котором работает экзонуклеаза
● Расщепляющий фермент	Фермент экзонуклеаза расщепляет не вступившие в реакцию линейные библиотеки
● Стоп-буфер	Буфер, в котором останавливается работа экзонуклеазы.
● Частицы для очистки ДНК	Необходимы для очистки циркуляризованных библиотек
● TE буфер Ц	Буфер для элюции циркуляризованных библиотек.

Характеристики набора

Аналитическая чувствительность – минимальная концентрация выделенной из FFPE и цельной крови ДНК в пробе, необходимая для проведения анализа, составляет 5 нг/мкл. Минимальная концентрация выделенной из плазмы ДНК в пробе, необходимая для проведения анализа, составляет 1 нг/мкл. Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей A260/280 нм, должна составлять не менее 1.6 – 1.8.

Предел обнаружения (LoD) - наименьшая частота мутантного аллеля в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA, которую способно выявлять изделие. Составляет 10%.

Значения диагностических характеристик набора

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Результаты испытаний с достоверной вероятностью 95%	
		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
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 для образцов ДНК, выделенных из FFPE-блоков, из цельной крови и плазмы крови

Метрика	Значение	Тип значения
Расчётная чувствительность	0.96	минимальное
Равномерность покрытия пула 1 (MAPD)	Не более 3	максимальное
Равномерность покрытия пула 2 (MAPD)	Не более 3	максимальное
Средняя глубина покрытия пула 1	5 000x	минимальное
Средняя глубина покрытия пула 2	5 000x	минимальное
Средняя глубина покрытия целевой последовательности	5 000x	минимальное

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор

Наименование	Пример модели и производителя
Термоциклер	Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США)
Магнитный штатив	Магнитный штатив для пробирок на 0,2 мкл стрипованных или однокостоящих МагниРэк-3202-0С (ООО «НПФ Хеликон», Россия, РЗН 2022/16360 от 21.01.2022)
Магнитный штатив	Магнитный штатив для пробирок на 1,5-2,0 мл МагниРэк-2415-0 (ООО «НПФ Хеликон», Россия, РЗН 2022/16360 от 21.01.2022).
Миницентрифуга-вортекс	Миницентрифуга-вортекс (FV-2400, SIA «Biosan», Латвия)
Спектрофотометр NanoDrop	Анализатор NanoDrop 2000с (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)
Пробирки 1,5 мл - 2 мл	Пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф, DNA LoBind, PCR clean, бесцветные (Eppendorf, Германия)
Стрипованные микропробирки	Пробирки в стрипах по 8 штук с отдельно прикрепленными плоскими крышками, PCR clean, бесцветные (MicroAmp® 8-Tube Strip, 0.2 ml #N8010580 Scientific Specialties Incorporated, США).
Штативы для пробирок 0,5 мл	Разные модели и производители
Центрифуга	Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 54xx, с принадлежностями (Centrifuge 5430) (Eppendorf AG, Германия).
ПЦР-бокс	БАВ-ПЦР-«Ламинар-С»; (620.100) (ЗАО «Ламинарные системы», Россия)

Штатив для стрипов и планшетов	Разные модели и производители
Штативы для пробирок разного объема (50 мл, 15 мл, 1,5 мл – 2,0 мл, 0,5 мл)	Разные модели и производители
Перчатки	Перчатки нитриловые неопудренные.
Спирт этиловый лабораторный, 96%	Разные 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
Вода деионизованная бидистиллированная	Разные производители
Пластиковый пинцет	Разные модели и производители
Пробирки типа Falcon 50 мл	Разные модели и производители
Наконечники для дозаторов с фильтром разного объема	Разные модели и производители
Секундомер механический однострелочный СО	Разные модели и производители
Холодные штативы для пробирок на 1,5-2 мл и для пробирок на 0,2 мл.	Разные модели и производители

Для экстракции ДНК из исследуемых образцов дополнительно понадобятся:

1. При работе с образцами цельной крови - набор «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики *in vitro* по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018» (ПУ №ПЗН 2019/9331 от 02.12.2019).
2. При работе с образцами парафиновых блоков (FFPE) – набор «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE блоков для диагностики *in vitro* по ТУ 9398-001-11248074-2017» (ПУ № ПЗН 2019/9172 от 14 апреля 2020) или «Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)» (ПУ №ФСЗ 2012/12715 от 03 августа 2017).
3. При работе с образцами плазмы – набор «Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNASample Preparation Kit, 24)» (ПУ №ФСЗ 2012/12715 от 03 августа 2017)

Для секвенирования библиотек дополнительно понадобятся:

1. Генетический секвенатор «Секвенатор генетический HELICON® секвенирования нового поколения» (ПЗН 2023/20825 от 16.08.2023).
2. «Набор реагентов MGI G50 для высокопроизводительного секвенирования, в вариантах исполнения»* (ПЗН 2023/21588 от 28.11.2023)/ «Набор реагентов MGI G400 для высокопроизводительного секвенирования, в вариантах исполнения»** (ПЗН 2023/21587 от 29.11.2023).

Анализируемые образцы и пробоподготовка

Для работы с набором необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из цельной крови, пробы опухолевой ДНК, выделенные из операционного (биопсийного) материала пациента, фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки), а также пробы свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы крови пациента («жидкостная биопсия»).

* Варианты исполнения, совместимые с Набором реагентов «HELICON® ABC Плюс»:
Набор реагентов G50 SM FCL PE100 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G50 SM FCL PE150 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G50 SM FCS PE100 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G50 SM FCS PE150 для высокопроизводительного секвенирования.

** Варианты исполнения, совместимые с Набором реагентов «HELICON® ABC Плюс»:
Набор реагентов G400 SM FCL PE100 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G400 SM FCL PE150 для высокопроизводительного секвенирования.

Для цельной крови необходимо соблюдать следующие требования: взятие крови проводится в пластиковые пробирки объёмом 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 парафиновых блоков (FFPE) необходимо соблюдать следующие требования: предварительно провести их морфологический анализ. Рекомендовано использовать образцы, в которых ткань опухоли занимает не менее 80% площади препарата, допустимое минимальное количество опухоли - не менее 20% 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.

Для выделения ДНК из плазмы крови пациента, следует соблюдать следующие правила: взятие крови, обычно 8 мл, проводится в специализированные пробирки, предназначенные для сбора, транспортировки и хранения образца венозной крови с целью анализа внеклеточной ДНК. Для перемешивания содержимого с антикоагулянтом и стабилизатором пробирку следует аккуратно перевернуть 8–10 раз. Пробирку с кровью следует хранить согласно инструкции производителя в темном месте при комнатной температуре.

Центрифугирование пробирки крови и отбор плазмы выполняется в лаборатории непосредственно перед выделением ДНК. На первом этапе центрифугирование проводят в пробирках с образцами крови в течение 15 минут на скорости 1900g при 4 °С. Не задевая осадка супернатант аккуратно переносят в чистые пробирки, затем еще раз центрифугируют 10 минут на 16000g при 4°С. Супернатант переносят в чистые пробирки. Далее следует переходить к выделению ДНК или заморозить и хранить супернатант при -20°С или -80°С до момента выделения.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Выделение ДНК из образцов цельной крови осуществляется с помощью набора «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики *in vitro* по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018» (ПУ №РЗН 2019/9331 от 02.12.2019), из парафиновых блоков (FFPE) - с помощью наборов «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE блоков для диагностики *in vitro* по ТУ 9398-001-11248074-2017» (ПУ № РЗН 2019/9172 от 14 апреля 2020) и «Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample

Preparation Kit, 24)» (РУ №ФСЗ 2012/12715 от 03 августа 2017), из плазмы крови - с помощью наборов «Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)» (РУ №ФСЗ 2012/12715 от 03 августа 2017).

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК, выделенной из цельной крови, операционного (биопсийного материала), фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки), с концентрацией **не менее 5 нг/мкл**.

Минимальная валидированная концентрация ДНК – 2 нг/мкл.

Для свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), выделенной из плазмы крови, концентрация ДНК должна быть **не меньше 1 нг/мкл**. Дополнительно рекомендуется провести фрагментный анализ выделенной сцДНК, чтобы убедиться, что в ней нет примеси геномной ДНК.

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 вортированием или пипетированием.
- Избегайте кросс-контаминации при работе с Адаптерами: 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°C 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 вортиксите, чтобы перемешать частицы. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.
- Для приготовления 80% этилового спирта смешайте 96% этиловый спирт с водой в расчете 500 мкл спирта 96% на 100 мкл воды на один образец. Используйте только свежеприготовленный 80% 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 «HELICON® ABC Плюс С-А» и «HELICON® ABC Плюс С-Б»:

1. Комплект для циркуляризации перенести и хранить в пост-ПЦР зоне
2. Комплект для циркуляризации хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C

I. Проведение целевого обогащения ДНК

! Работа проводится в Пре-ПЦР зоне

Потребуется:

- ПЦР-смесь 1
- Раствор праймеров 1
- Раствор праймеров 2
- КО
- Анализируемые образцы ДНК (концентрация выделенных из FFPE-блоков или цельной крови - 5 нг/мкл; концентрация выделенных из плазмы крови от 1нг/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.

! 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:

Количество циклов	Шаг	T°C	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °C	15 мин
19 циклов для плазмы - 22 цикла	Денатурация	99 °C	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °C	4 мин
1 цикл	Хранение	4°C	∞



ПЦР продукт может храниться 1 ночь при 4-10°C, при более долгом хранении ПЦР продукт должен храниться при -20°C

II. Приготовление библиотек ДНК

! 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	Время	Кол-во циклов
50°C	10 минут	
55°C	10 минут	
60°C	20 минут	1
10°C	Хранение не более 1 часа	

По окончании программы незамедлительно приступить к следующему шагу.

2. Лигирование адаптеров к ампликонам

Потребуется:

- ПЦР продукт, обработанный Активатором
- Раствор Л
- Адаптеры
- ДНК-лигаза

- 4 К каждому образцу внести по 2 мкл Адаптера. Зафиксировать номер адаптера, соответствующий каждому образцу в таблице (см. Приложение или <https://oncoatlas.ru/abcplusmtable.pdf>). В одном запуске секвенирования каждому образцу должен соответствовать уникальный (неповторяющийся) адаптер — это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Адаптеры из наборов с литерами «А» и «Б» можно комбинировать между собой.
- 5 Тщательно перемешать пипетированием. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.
- 6 Приготовить смесь 2 мкл ДНК-Лигазы и 4 мкл Буфера Л на необходимое количество образцов согласно схеме, добавить к каждому образцу по 6 мкл премикса.

Компонент	Объем на 1 реакцию
● ДНК-Лигаза	2 мкл
● Буфер Л	4 мкл
Всего	6 мкл

Общий объем смеси составит 30 мкл. Пробирки плотно закрыть, перемешать содержимое, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

- 7 Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

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



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



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



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

- 8 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

- 9 Внести 42 мкл приготовленной суспензии в каждую пробирку с библиотекой, перемешать пипетированием, инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
- 10 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.
- 11 Перенести супернатант в новую чистую пробирку, не задевая осадок частиц.



Супернатант содержит библиотеку.

4. Второй этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- ✗ Магнитные частицы
- Свежеприготовленный 80% этанол



Поместите ПЦР-смесь 2 на комнатную температуру, она понадобится на этапе Преамплификации библиотек п.20.

- 12 Внести 58 мкл Магнитных частиц (неразведенных!) в каждую пробирку с супернатантом, содержащую библиотеку, тщательно перемешать пипетированием.
- 13 Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
- 14 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.
- 15 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. 14-15.



Библиотека содержится на магнитных частицах!

16. Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 80% этанола в каждую пробирку и четырежды переместить стрип в магнитном штативе относительно рядов, или тщательно перемешать, для промывки магнитных частиц. Инкубировать на магнитном штативе пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
17. 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. 17.
18. Повторить шаги 16-17 для повторной промывки магнитных частиц.
19. 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.



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
- Смесь праймеров 3



Поместите Реагент В и ТЕ на комнатную температуру, они понадобятся на этапе Очистки преамплифицированной библиотеки.

- 20 Приготовить раствор для амплификации согласно схеме:

Компонент	Объем на 1 реакцию
● ПЦР-смесь 2	48 мкл
● Смесь праймеров 3	4 мкл
Всего	52 мкл

- 21 Добавить в каждую пробирку по 52 мкл раствора.
- 22 Перемешать содержимое на вортексе, чтобы ресуспендировать магнитные частицы и осадить на центрифуге для сбора капель. Установить пробирки в термоциклер.
- 23 Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	98°C	2 минуты
12 циклов	98°C	20 секунд
	60°C	30 секунд
	72°C	30 секунд
1 цикл	72°C	10 минут
Хранение	10°C	~1 час или более



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 80% этанол
- TE буфер

- 24 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.
- 25 Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.
- 26 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.
- 27 Добавить к Магнитным частицам 150 мкл свежеприготовленного 80% этанола и подождать 30 секунд, не снимая пробирку с магнитного штатива. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.
- 28 Повторить шаг 27 для повторной промывки магнитных частиц.
- 29 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.



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

- 30 Удалить пробирку с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ буфера.
- 31 Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадить на центрифуге для сбора капель.
- 32 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.

- 33 Необходимое минимальное количество библиотеки - 1 пМоль. При средней длине библиотеки панели HELICON® ABC Плюс в 213 нуклеотидов, 1 pmol библиотеки соответствует 140 нг. Рассчитывается по формуле $1 \text{ pmol ПЦР-продукта} = \text{Длина ДНК фрагмента(нк)} * 660 \text{ нг/1000 нуклеотидов}$. Если для каждого образца необходимо одинаковое количество данных секвенирования, следует смешать библиотеки в равном количестве. Необходимое количество образца вычисляется по формуле: $\text{Масса каждого образца (ng)} = 140 \text{ нг (масса (ng)=1pmol)} / \text{количество образцов}$
- 34 Например, если в запуске 48 образцов, то каждой библиотеки в смеси должно быть по 2,9 нг, в объеме не более 48 мкл.
- 35 Приготовить эквимольную смесь библиотек в количестве не менее 1 пМоль и объемом не более 48 мкл.
- 36 В одном анализе (цикле секвенирования) может быть исследовано до 96 библиотек, приготовленных из ДНК, выделенной из опухолевой ткани, до 96 библиотек, приготовленных из образцов ДНК, выделенной из крови, включая контрольные образцы и до 96 библиотек, приготовленных из образцов ДНК, выделенной из плазмы.



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



III. Циркуляризация библиотек

Для циркуляризации библиотек контрольных образцов используются соответствующие комплекты из состава наборов «HELICON® ABC Плюс С-А» и «HELICON® ABC Плюс С-Б».

- 1 Необходимо пулировать библиотеки таким образом, чтобы общее количество пулированной библиотеки составило 1 пмоль при объеме не более 48 мкл.
- 2 Перенести 1 пмоль пулированной библиотеки в новую пробирку для ПЦР объемом 0,2 мл. Добавить ТЕ буфер Ц до общего объема 48 мкл.
- 3 Установить 0,2 мл ПЦР-пробирки с библиотеками в термоциклер.
- 4 Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
Нагрев крышки	Включить
95°C	3 минуты

- 5 По окончании реакции незамедлительно положить пробирки в лед на 2 минуты (чтобы денатурированные цепи ДНК остались денатурированными), после чего кратковременно центрифугировать.
- 6 Приготовить раствор для циркуляризации одноцепочечных библиотек на льду. Смешать компоненты в следующем соотношении:

Компонент	Объем
 Сплинт буфер	11,6 мкл
 ДНК-лигаза Ц	0,5 мкл
Всего	12,1 мкл

- 7 Перенести смешанный раствор для циркуляризации одноцепочечных библиотек в пробирку с 48 мкл денатурированных библиотек, перемешайте 3-х кратным вортексированием. Общий объем составит 60,1 мкл.



8 Сбросить капли коротким центрифугированием

9 Перенести пробирки в термоциклер и запустить следующую программу:

Температура	Время
Нагрев крышки	45°C/Выключен
37°C	30 минут
4°C	∞

10 После завершения программы незамедлительно перенести пробирки на лед для следующей реакции.

11 Смешать на льду следующие реагенты, пока идет реакция из п. 10.

Компонент	Объем
 Буфер для расщепления	1,4 мкл
 Расщепляющий фермент	2,6 мкл
Всего	4 мкл

12 Внесите 4 мкл получившейся смеси в ПЦР-пробирки из п. 10. Провортексируйте 3 раза (3 сек каждую) и сбросьте капли кратким центрифугированием для сбора раствора на дне пробирок. Общий объем смеси составит 64,1 мкл.

13 Установить пробирки в термоциклер

14 Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение следующей программы:

Температура	Время
Нагрев крышки	45°C/Выключен
37°C	30 минут
4°C	∞

- 15 По завершению программы сбросьте капли с крышек пробирок кратким центрифугированием.
- 16 Добавьте 7,5 мкл Стоп-буфера. Провортексируйте 3 раза (3 секунды каждую) и сбросьте капли на дно пробирки кратким центрифугированием. Объем смеси составит 71,6 мкл. Перенесите весь раствор в чистые 1,5 мл пробирки.
- 17 Достаньте Частицы для очистки ДНК из холодильника и дайте прогреться до комнатной температуры в течение 30 минут. Провортексируйте тщательно до гомогенного состояния перед использованием.
- 18 Добавить 170 мкл Частиц для очистки ДНК к продукту реакции ферментативного расщепления из 17. Перемешать пипетированием не менее 10 раз или провортексировать до гомогенного состояния.
- 19 Инкубировать при комнатной температуре 10 мин.
- 20 Сбросить капли кратким центрифугированием, поместить пробирки на магнитный штатив. Инкубировать 2-5 минут или пока жидкость в пробирках не станет прозрачной. Аккуратно отобрать супернатант, не задевая магнитные частицы, и выбросить.
- 21 Добавить 500 мкл свежеприготовленного 80% спирта, не задевая частицы. Инкубировать 30 секунд. Аккуратно удалить и выбросить супернатант.
- 22 Повторить п. 21. 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. Если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку, повторить инкубацию и отобрать спирт заново. Просушить магнитные частицы на воздухе, не вынимая пробирку из магнитного штатива. Не допускайте потрескиваний на магнитных частицах.
- 23 Убрать 1,5 мл пробирки с магнитного штатива и добавить 32 мкл ТЕ буфера Ц для элюции библиотек. Перемешать 10-ти кратным пипетированием или вортексированием, пока частицы полностью не ресуспендируются.
- 24 Инкубировать 10 минут на столе.
- 25 Кратко центрифугировать для сбора капель и поместить пробирки обратно на магнитный штатив. Инкубировать 2-5 минут или пока жидкость не станет прозрачной. Перенести 30 мкл супернатанта в чистые 1,5 мл пробирки.

- 26 Для контроля пройденной циркуляризации необходимо рассчитать отношение количества одноцепочечной циркуляризованной библиотеки (концентрация (нг/мкл)*объем (мкл)) к количеству пулированной библиотеки (140 нг), взятой на циркуляризацию. Она должна быть $\geq 0,07$ (но меньше 0,5). Например, если было взято 140 нг (1 пмоль пулированной библиотеки длиной 213 нуклеотидов), то концентрация циркуляризованной библиотеки должна быть $\geq 0,33$ нг/мкл. В случае, если концентрация оказалась меньше – следует повторить протокол циркуляризации библиотек.



При необходимости пробирки можно хранить при температуре не выше -20°C один месяц.

- 27 Концентрация циркуляризованной библиотеки должна быть ≥ 3 фемтомоль/мкл, а для каждой реакции по изготовлению наночастицы требуется 60 фемтомолей такой библиотеки.

Для пересчета концентрации в фемтомоль/мкл следует воспользоваться следующей формулой:

$$C \text{ (фемтомоль/мкл)} = 3030 * C \text{ (нг/мкл)} / N \text{ (длина библиотеки в нуклеотидах - 213)}.$$

Например, концентрация циркуляризованной библиотеки – 0,5 нг/мкл, это соответствует концентрации $3030 * 0,5 / 213 = 7,11$ фемтомоль/мкл.

IV. Подготовка образцов к секвенированию и секвенирование

Этапы подготовки библиотек к секвенированию и секвенирование могут проводиться при использовании системы «Секвенатор генетический HELICON®» (РЗН 2023/20825 от 16.08.2023) производства ООО «Ухань ЭмДжиАй Тех Ко., Лтд.»

Для подготовки библиотек к секвенированию ДНК и проведению секвенирования библиотек образцов на приборе Секвенатор генетический HELICON® G50 необходимо использовать соответствующие комплекты из состава наборов «Набор реагентов MGI G50 для высокопроизводительного секвенирования, в вариантах исполнения» (РЗН 2023/21588 от 28.11.2023) и действовать согласно инструкции производителя*.

Для подготовки библиотек к секвенированию ДНК и проведению секвенирования библиотек образцов на приборе Секвенатор генетический HELICON® G400 необходимо использовать соответствующие комплекты из состава наборов «Набор реагентов MGI G400 для высокопроизводительного секвенирования, в вариантах исполнения» (РЗН 2023/21587 от 29.11.2023)** и действовать согласно инструкции производителя.

Для секвенирования библиотек рекомендуется использовать парно-концевой режим секвенирования с прочтением 102 нуклеотидов для прямого и обратного рида, причем первые 2 цикла каждого рида должны быть «темными». Для настройки режима секвенирования следует руководствоваться разделом № 7 Руководства по эксплуатации Секвенатора генетического HELICON® (РЗН 2023/20825 от 16.08.2023).

* Варианты исполнения, совместимые с Набором реагентов «HELICON® ABC Плюс»:
Набор реагентов G50 SM FCL PE100 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G50 SM FCL PE150 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G50 SM FCS PE100 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G50 SM FCS PE150 для высокопроизводительного секвенирования.

** Варианты исполнения, совместимые с Набором реагентов «HELICON® ABC Плюс»:
Набор реагентов G400 SM FCL PE100 для высокопроизводительного секвенирования;
Набор реагентов G400 SM FCL PE150 для высокопроизводительного секвенирования.

V. Анализ данных и интерпретация результатов

В ходе секвенирования секвенатор автоматически распознает азотистые соединения, а также выполняет вывод необработанных данных секвенирования в виде файлов формата FASTQ по завершении секвенирования.

- 1 Анализ полученных на секвенаторе данных в виде файлов формата FASTQ осуществляется с помощью программного обеспечения от производителя набора реагентов ООО «ОНКОАТЛАС» Solo AVES <https://aves.oncoatlas.ru/>, версия 1.03.04 от 04.02.2023.
- 2 Файлы FASTQ, полученные в рамках анализа полученных на секвенаторе данных с помощью программного обеспечения от поставщика генетического секвенатора, могут быть проанализированы с помощью программного обеспечения от производителя набора реагентов ООО «ОНКОАТЛАС» Solo AVES <https://aves.oncoatlas.ru/>, версия 1.03.04 от 04.02.2023. Анализ файлов FASTQ с помощью программного обеспечения от поставщика набора реагентов осуществляется через веб-браузер (поддерживается веб-браузером Chrome™ версии 39) при наличии доступа в интернет со скоростью загрузки не менее 1Mbps и скоростью отдачи не менее 10Mbps. Для начала работы с программным обеспечением от поставщика необходимо перейти по ссылке <https://aves.oncoatlas.ru/> и выполнить вход в систему по паре логин/пароль, полученной от производителя набора реагентов, после чего нажать кнопку «Войти».

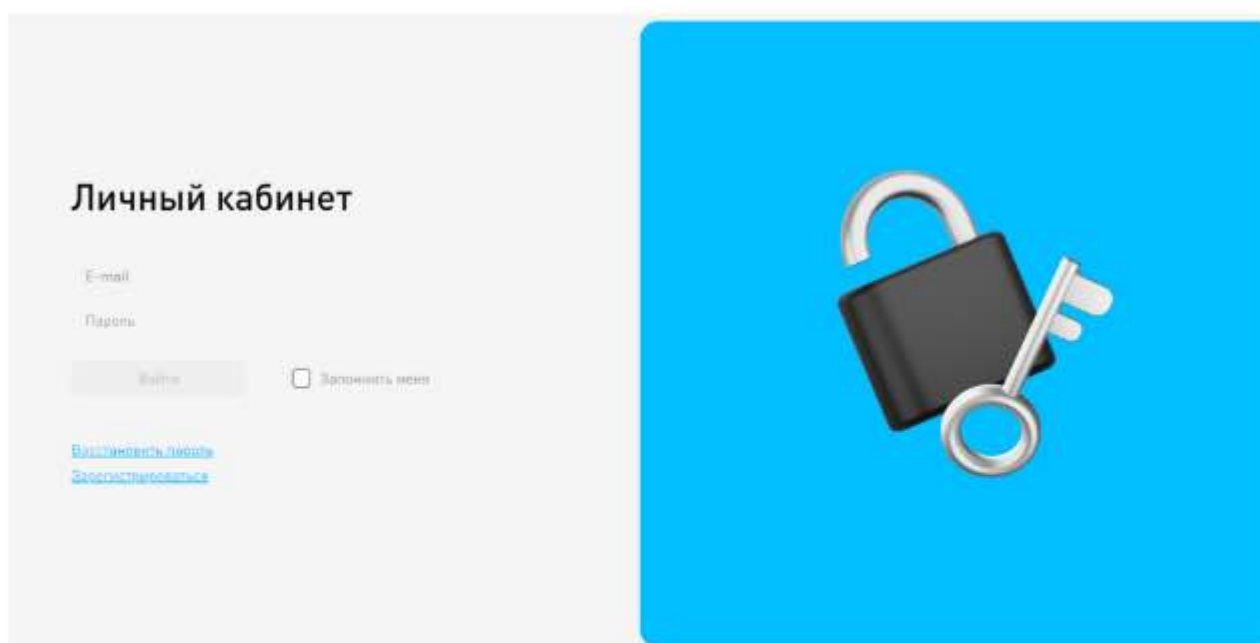


Рисунок 2. Вход в программное обеспечение Solo AVES

В течение не более полугода после получения наборов реагентов пара логин/пароль, в случае если не предоставлялась пользователю ранее, предоставляется производителем набора реагентов в срок не более 7 рабочих дней после запроса пользователя электронным путем (электронная почта, запрос направляется на почту it-solo@oncoatlas.ru).

3 Создание заявки на анализ данных.

Шаг 1. Перейти в раздел «Запустить анализ данных»

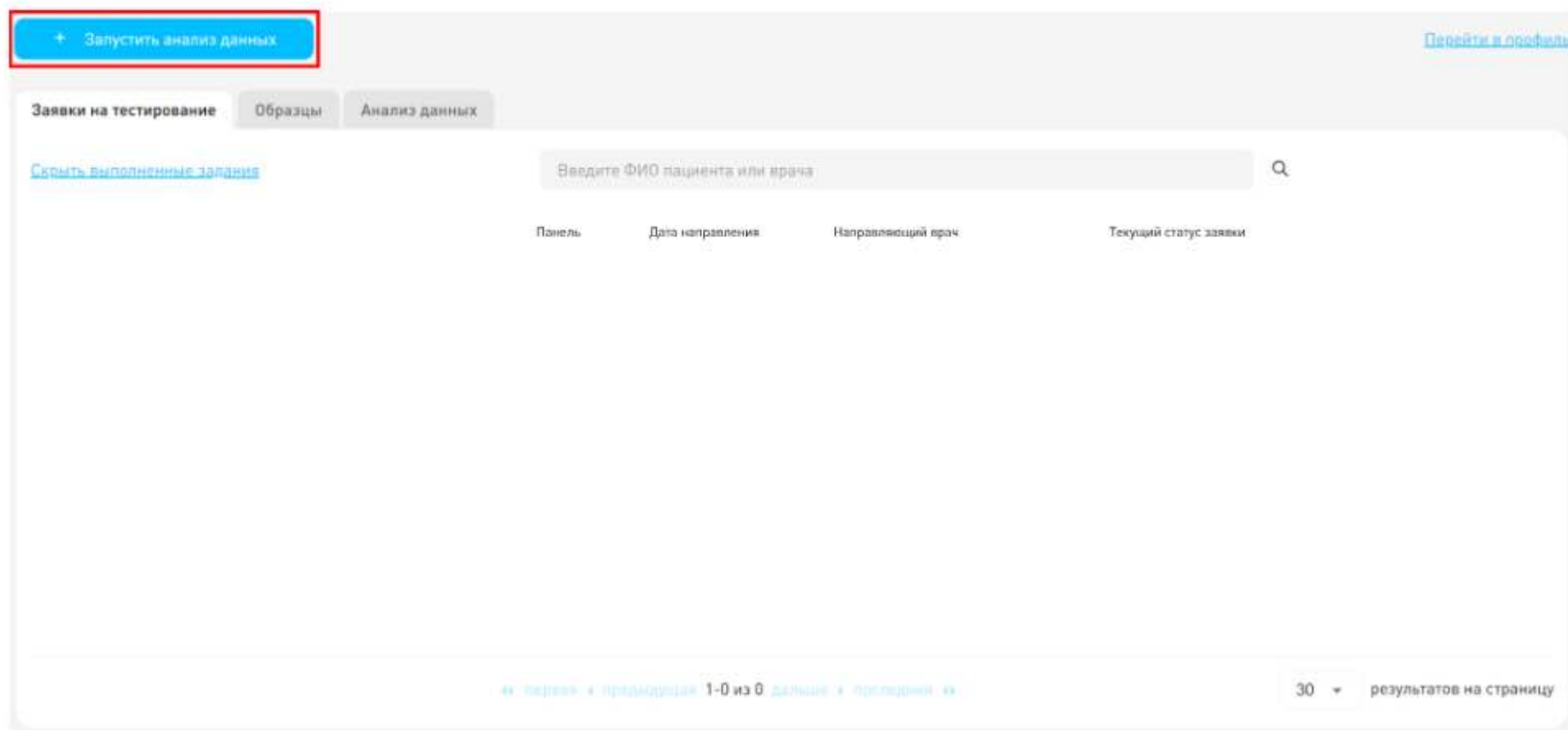


Рисунок 3. Экран запуска анализа данных

Шаг 2. Откроется окно создания заявки на анализ данных. В рамках одной заявки на анализ данных можно проанализировать любое количество образцов, которые секвенировались в рамках одного запуска прибора. Для создания заявки на анализ данных необходимо:

1. Ввести информацию о запуске;
2. Добавить данные секвенирования;

3. Ввести информацию об образцах, которые соответствуют добавленным данным секвенирования.



Крайне не рекомендуется в рамках одной заявки на анализ данных анализировать данные секвенирования с разных запусков одного или нескольких секвенаторов. **Крайне рекомендуется** в рамках одной заявки на анализ данных анализировать все данные, которые были получены в рамках одного запуска прибора с помощью наборов реагентов от ООО "ОНКОАТЛАС"; создание отдельных заявок на анализ данных на каждый отдельный образец **не рекомендовано**.

В новом окне заполнить дату секвенирования и выбрать из выпадающего окна платформу секвенирования.

На главную [Перейти в профиль](#)

Дата запуска ▼

Платформа секвенирования ▼

Запустить анализ

Пока не добавлен ни один образец. Добавьте все образцы, которые были в запуске.

[+ Добавить новый образец](#)

Рисунок 4. Заполнение информации о дате запуска и платформе секвенирования

Шаг 3. С помощью кнопки «Добавить новый образец» добавьте данные секвенирования

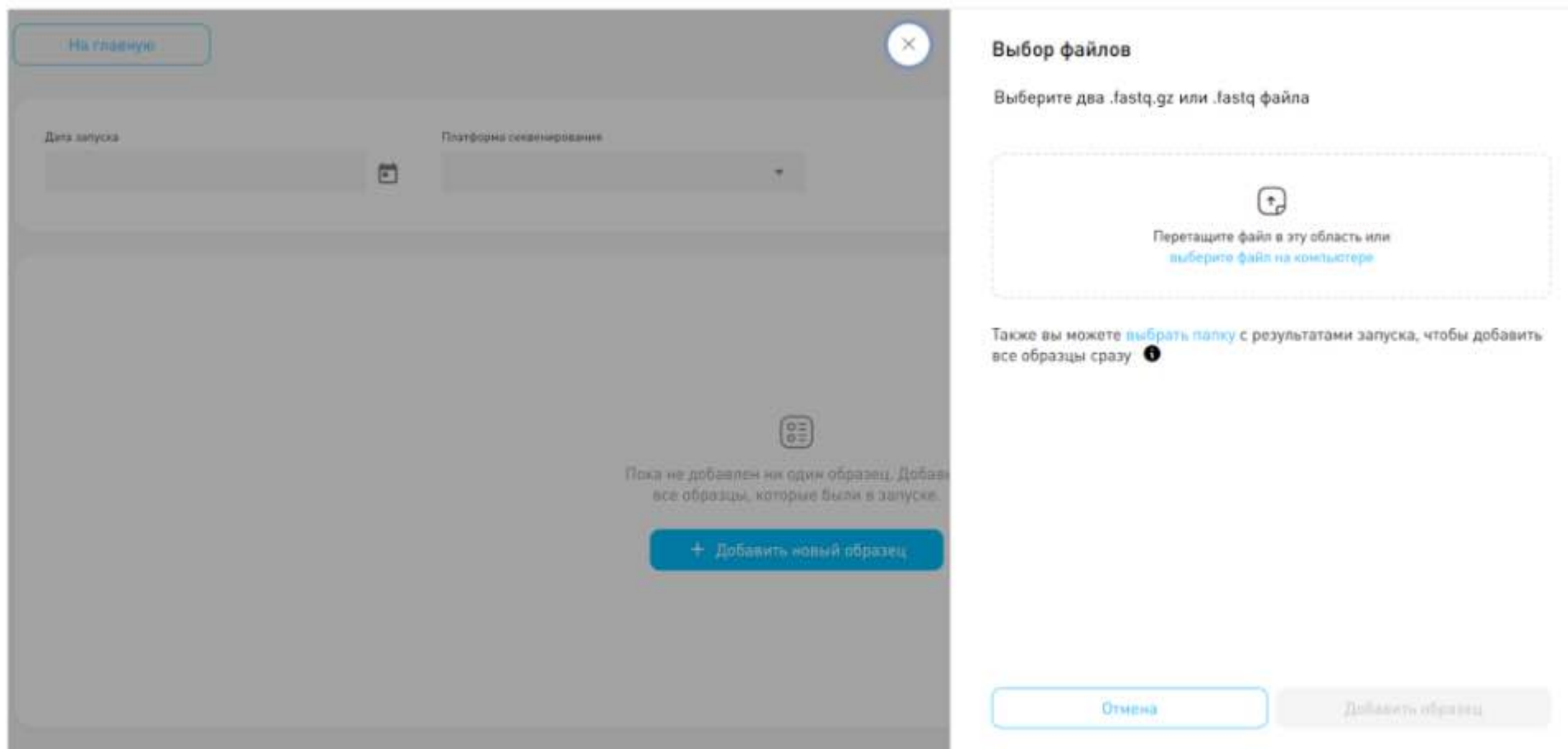


Рисунок 5. Окно добавления данных секвенирования

- 3.1 Возможно добавление отдельного образца. Для этого необходимо выбрать два .fastq файла с компьютера и нажать «Добавить образец»

A

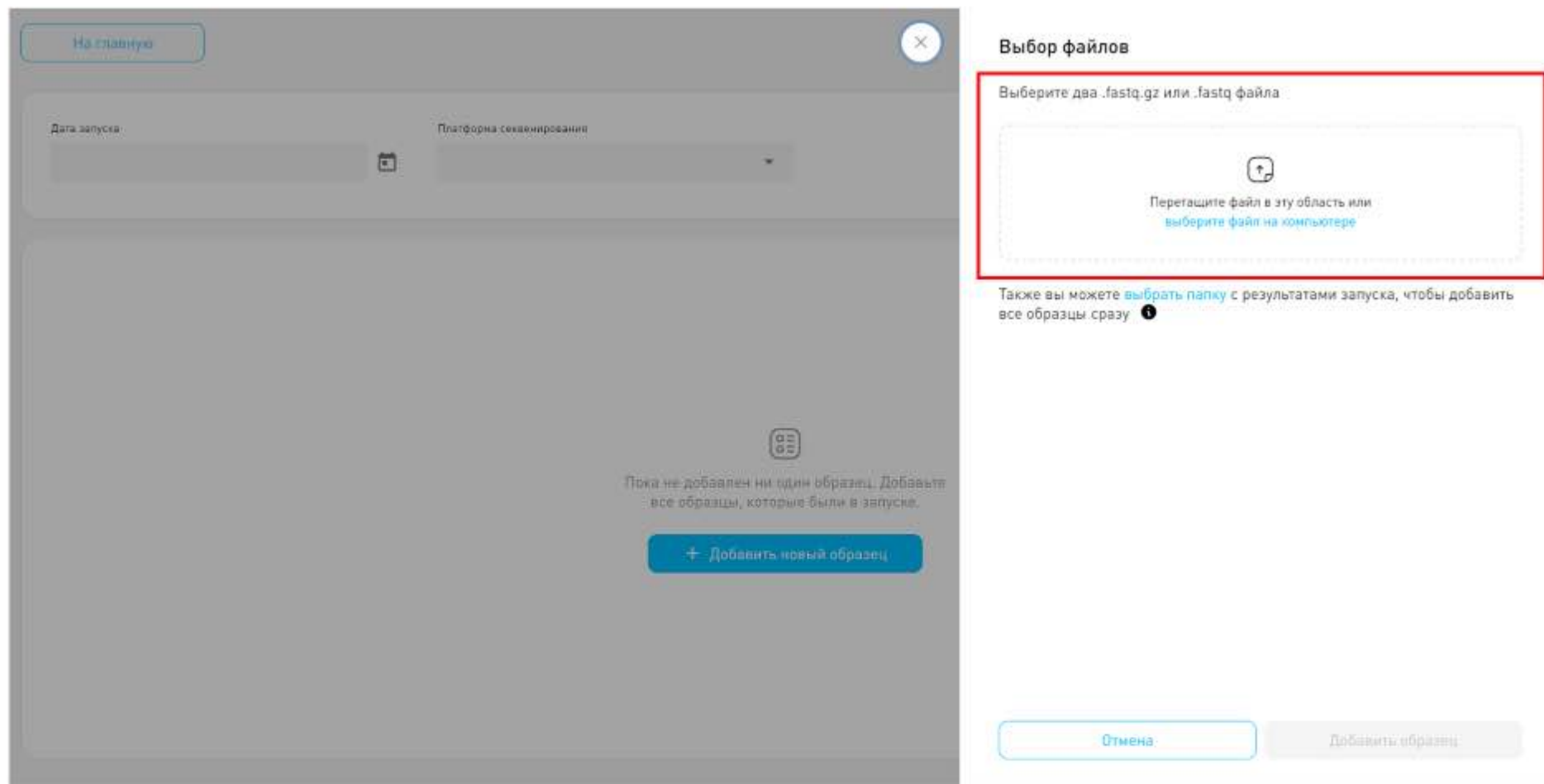


Рисунок 6. Добавление данных секвенирования одного образца. Красной рамкой выделена область добавления .fastq файлов

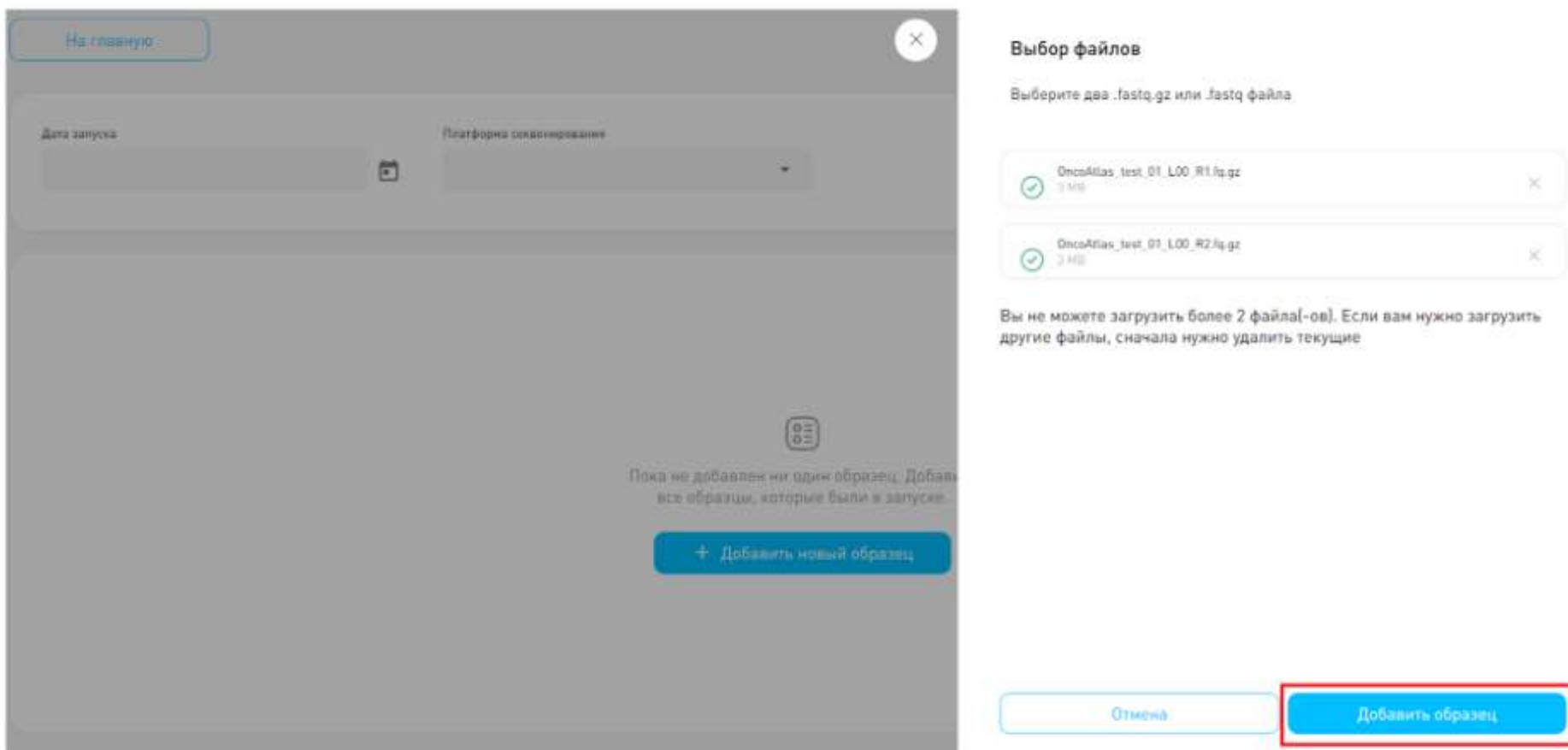
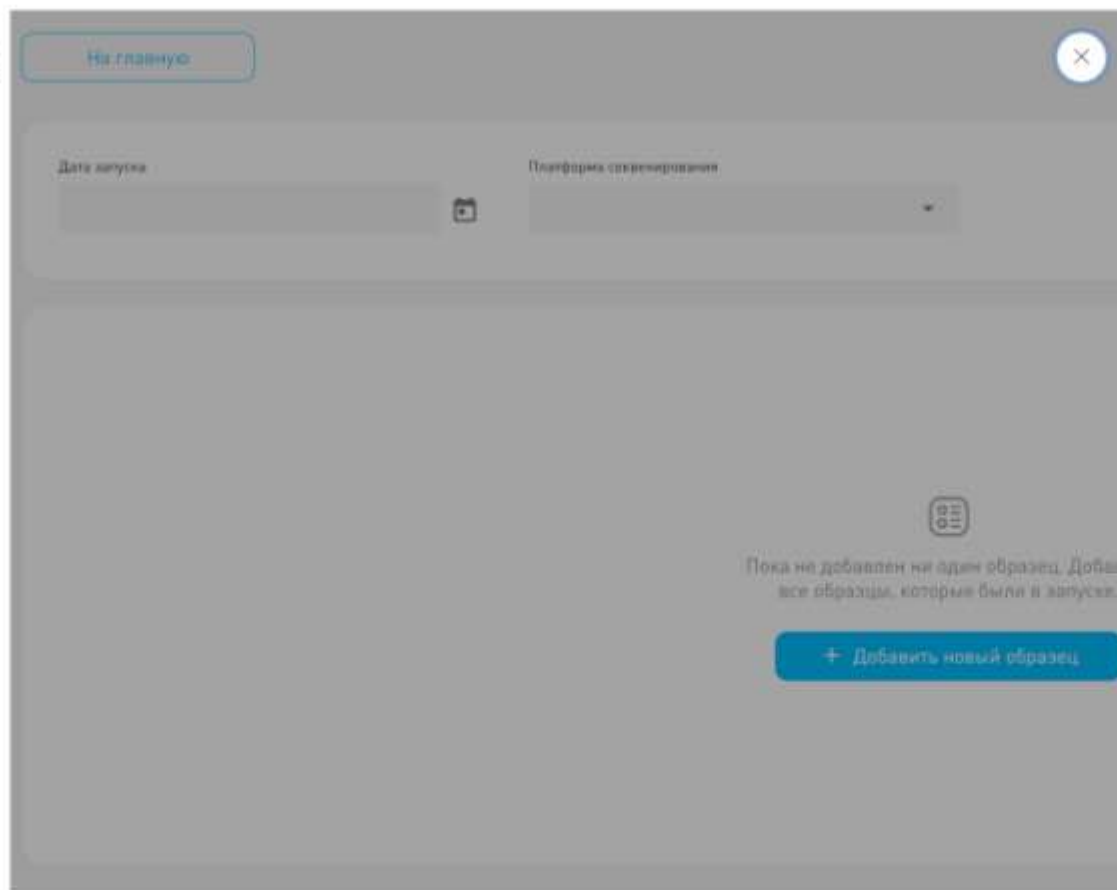
Б

Рисунок 6. Добавление данных секвенирования одного образца. Красной рамкой выделена кнопка «Добавить образец»

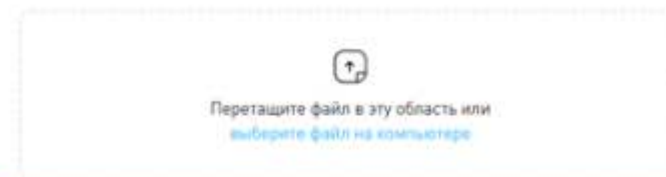
- 3.2 Также возможно добавление всех образцов, которые были в запуске. Для этого необходимо нажать «выбрать папку», в открывшемся окне выбрать папку на компьютере с результатами секвенирования. После загрузки всех образцов нажать «Добавить образцы».

A



Выбор файлов

Выберите два .fastq.gz или .fastq файла



Также вы можете **выбрать папку** с результатами запуска, чтобы добавить все образцы сразу **!**



Рисунок 7. Добавление данных секвенирования всех образцов запуска. Красной рамкой выделена область выбора папки

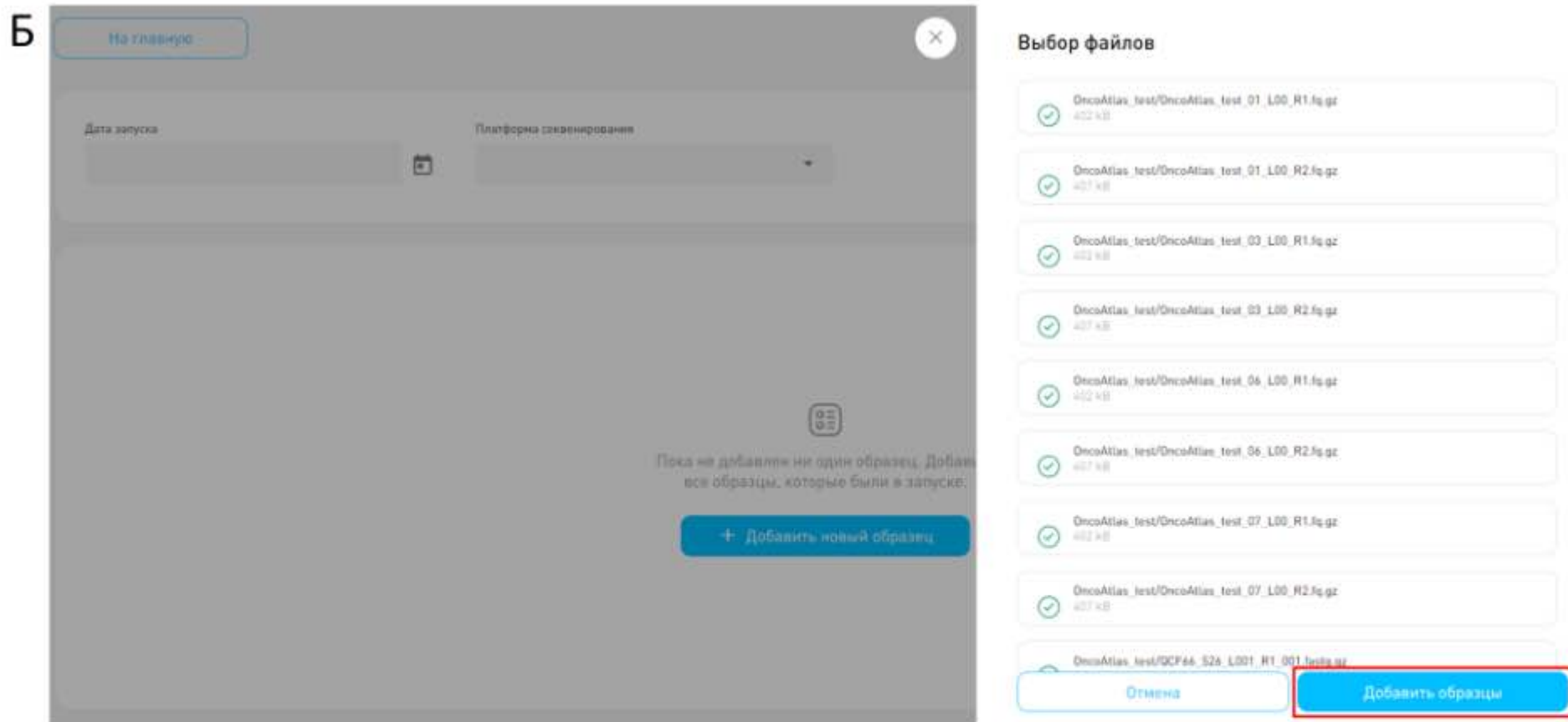


Рисунок 7. Добавление данных секвенирования всех образцов запуска. Красной рамкой выделена кнопка «Добавить образец»

Если после выбора папки не было обнаружено данных секвенирования, необходимо перейти к шагу (3.1) и добавить каждый образец отдельно.

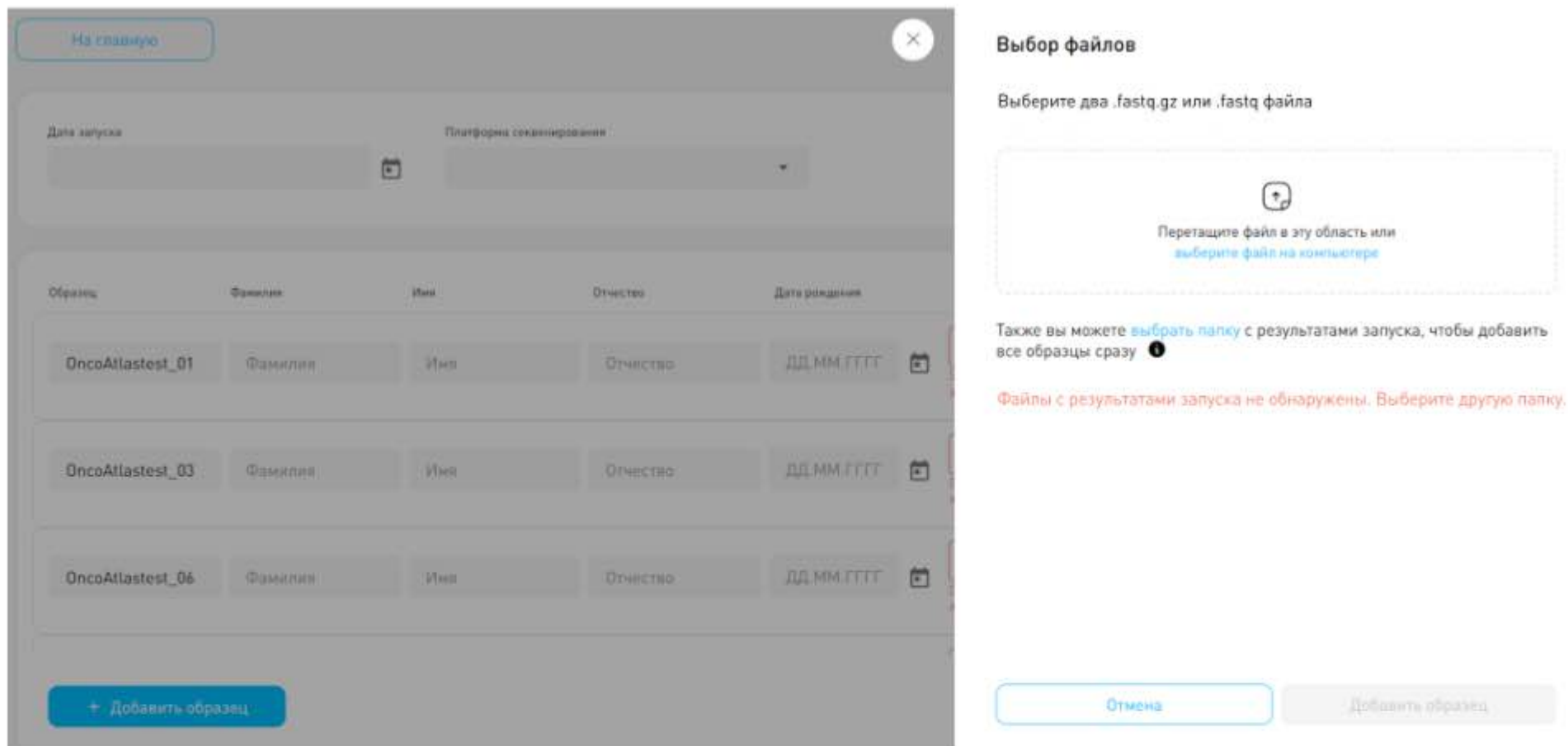


Рисунок 8. Возможное предупреждение о неудачной попытке добавления данных секвенирования всех образцов запуска

Шаг 4. После шага 3 добавить дополнительные образцы, которые секвенировались в рамках одного запуска секвенатора, можно с помощью кнопки «Добавить образец». Рекомендуется в рамках одной заявки на анализ данных добавить все образцы, которые были в запуске, и которые секвенировались с помощью набора реагентов от компании ООО «ОНКОАТЛАС». В рамках одной заявки на анализ данных нельзя добавлять данные секвенирования с разных запусков одного прибора или разных приборов.

На главную [Перейти в профиль](#)

Дата запуска: 14.10.2022 Платформа секвенирования: Helicon Запустить анализ

Образец	Фамилия	Имя	Отчество	Дата рождения	Тип образца	Заболевание	ПКО	ОКО	
OncoAtlastest_01	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	Тип образца <small>Это поле обязательно для заполнения.</small>	Заболевание	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
OncoAtlastest_03	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	Тип образца <small>Это поле обязательно для заполнения.</small>	Заболевание	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
OncoAtlastest_06	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	Тип образца <small>Это поле обязательно для заполнения.</small>	Заболевание	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

[+ Добавить образец](#)

Рисунок 9. Добавление данных секвенирования дополнительных образцов

Шаг 5. Для каждого добавленного образца необходимо указать тип анализа (колонка «Тип образца»):

- FFPE: ДНК, выделенная из FFPE материала
- WB: ДНК, выделенная из цельной крови (геномная ДНК)
- PLASMA: ДНК, выделенная из плазмы/сыворотки крови (свободно циркулирующая ДНК)

На главную [Перейти в профиль](#)

Дата запуска: 14.10.2022 Платформа секвенирования: Helicon Запустить анализ

Образец	Фамилия	Имя	Отчество	Дата рождения	Тип образца	Заболевание	ПКО	ОКО	
Sample1	Астахов	Константин	Константинович	19.03.1990	PLASMA	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sample2	Симошенко	Виталий	Сергеевич	02.05.1981	FFPE	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sample3	Карцман	Анастасия	Витальевна	03.02.1983	FFPE	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
OncoAtlas_test	Фамилия	Имя	Отчество	DD.MM.YYYY	Тип образца	Заболевание	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
ONC44574	Фамилия	Имя	Отчество	DD.MM.YYYY	FFPE	Заболевание	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

+ Добавить образец

Рисунок 10. Указание данных для каждого добавленного образца

Также для каждого образца рекомендовано (не обязательно) указать заболевание пациента (колонка «Заболевание») – информация о заболевании используется в дальнейшем для интерпретации результатов анализа данных и генерации отчета.

Указание Фамилии, Имени, Отчества и Даты рождения не обязательно, но рекомендовано. Эта информация используется для:

1. генерации отчета
2. автоматического соотнесения данных секвенирования от одного пациента (в случае, если от одного пациента в рамках одного или нескольких запусков было проанализировано больше одного образца)
3. связи с ЛК врача и бесшовной отправкой отчета о секвенировании направляющему врачу.

Информацию о заболевании, ФИО, дате рождения пациента также можно указать после завершения анализа по заявке на анализ данных.

В колонке «ПКО» необходимо указать образец, который использовался как контрольный образец (КО). В рамках одной заявки на анализ данных может быть использован только один КО. Наличие КО не является обязательным для завершения заявки на анализ данных.



Программное обеспечение «Solo AVES» позволяет анализировать данные, полученные с помощью тест-наборов, производителем которых является ООО «ОНКОАТЛАС». ПО «Solo AVES» не предназначено для анализа данных, полученных с помощью наборов реагентов от других производителей. Конкретный набор реагентов, который использовался для секвенирования определяется в ходе анализа данных.

С помощью иконки «корзина» можно удалить образец из таблицы, если он был добавлен ошибочно. Удаленный образец можно добавить обратно с помощью шага (3.1). С помощью иконки «глаз» можно исключить образец из анализа, не удаляя его из таблицы – этот образец не будет включен в заявку на анализ данных.

На главную [Перейти в профиль](#)

Дата запуска: 14.10.2022 Платформа секвенирования: Helicon Запустить анализ

Образец	Фамилия	Имя	Отчество	Дата рождения	Тип образца	Заболевание	ПКО	ОКО	
Sample1	Астахов	Константин	Константинович	19.03.1990	PLASMA	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sample2	Симоненко	Виталий	Сергеевич	02.05.1981	FFPE	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sample3	Карцман	Анастасия	Витальевна	03.02.1983	FFPE	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
OncoAtlas_test	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	Тип образца	Заболевание	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
00044574	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	FFPE	Заболевание	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

+ Добавить образец

Рисунок 11. Удаление и исключение образца из анализа данных

Шаг 6. После завершения ввода информации запуск анализа осуществляется с помощью кнопки «Запустить анализ»

На главную [Перейти в профиль](#)

Дата запуска: 14.10.2022 Платформа секвенирования: Helicon Запустить анализ

Образец	Фамилия	Имя	Отчество	Дата рождения	Тип образца	Заболевание	ПКО	ОКО
Sample1	Астахов	Константин	Константинович	19.03.1990	PLASMA	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sample2	Симоненко	Виталий	Сергеевич	02.05.1981	FFPE	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sample3	Карцман	Анастасия	Витальевна	03.02.1983	FFPE	C22.1,C23-24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
OncoAtlas_test	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	Тип образца	Заболевание	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
00000000	Фамилия	Имя	Отчество	ДД.ММ.ГГГГ	FFPE	Заболевание	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

+ Добавить образец

Рисунок 12. Запуск анализа данных

Шаг 7. После создания заявки на анализ данных, её статус можно посмотреть на главной странице на вкладке «Анализ данных». Статус заявки указан в колонке «Статус». После окончания анализа данных, заявка перейдет в статус «Анализ завершен», который будет отображен в колонке статуса.

[+ Запустить анализ данных](#) [Перейти в профиль](#)

Заявки на тестирование Образцы **Анализ данных**

Дата запуска анализа	Дата секвенирования	Платформа	Статус	Всего образцов	Прошли QC	Версия пайплайна	
21.12.2023	15.12.2023	Helicon	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮
18.12.2023	15.12.2023	Helicon	Интерпретация результатов	17	9	2.12	
05.12.2023	24.11.2023	Illumina MiSeq	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮
30.11.2023	24.11.2023	GeneMind GenoLab M	Анализ завершен	2	2	2.12	⋮
28.11.2023	04.11.2023	Helicon	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮

« ← первая » **превью** 1-5 из 5 **далее** » [последняя](#) »

30 результатов на страницу

Рисунок 13. Актуализация статуса заявки на анализ данных

- 4 Просмотр результатов анализа. После завершения анализа данных результаты можно скачать на вкладке «Анализ данных» в виде таблицы .xlsx, либо в формате .pdf.

+ Запустить анализ данных [Перейти в профиль](#)

Заявки на тестирование Образцы **Анализ данных**

Дата запуска анализа	Дата секвенирования	Платформа	Статус	Всего образцов	Прошли QC	Версия пайплайна	
21.12.2023	15.12.2023	Helicon	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮
18.12.2023	15.12.2023	Helicon	Интерпретация результатов	17	9	2.12	
05.12.2023	24.11.2023	Illumina MiSeq	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮
30.11.2023	24.11.2023	GeneMind GenoLab M	Анализ завершен	2	2	2.12	
28.11.2023	04.11.2023	Helicon	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮

⌄ Скачать все отчеты

⌄ Скачать таблицу с результатами

«<» < < предыдущие 1-5 из 5 данных > >»

30 < результатов на страницу

Рисунок 14. Выгрузка данных после анализа

Таблица с результатами скачивается в формате .xlsx. В книге EXCEL присутствуют листы: «QC» и «result». На листе «QC» отражены результаты анализа качества данных. В столбце «RESULT» указывается итоговый результат:

- PASS – образец прошел контроль качества данных.
- FAIL* – образец не прошел контроль качества данных

Также на листе QC отражены контрольные метрики анализа качества данных:

- TotalReads – общее количество чтений
- ReadsPool1 – количество чтений в пуле 1 (для двухпульных панелей)
- ReadsPool2 – количество чтений в пуле 2 (для двухпульных панелей)
- Q30 – количество н.п. с качеством прочтения выше Q30
- OnTargetFraction – количество прочтений, картируемых на целевые области генома
- Uniformity – равномерность покрытия (процент целевых регионов с покрытием 0.2 и выше от среднего покрытия целевого региона)
- SensGermlineAC – интегральная расчетная чувствительность детектирования известных клинически-значимых (патогенных) наследственных мутаций-основателя (если панель их покрывает) (в соответствии с [Ivanov et al., 2019])
- SensGermlineHP – интегральная расчетная чувствительность детектирования известных распространенных наследственных генетических вариантов, которые могут быть ассоциированы с чувствительностью к терапии / повышенными рисками онкологических заболеваний (в соответствии с [Ivanov et al., 2019]).
- SensSomaticAC – интегральная расчетная чувствительность детектирования известных клинически-значимых соматических мутаций (в соответствии с [Ivanov et al., 2019])
- SensSomaticHP – интегральная расчетная чувствительность детектирования соматических мутаций в известных рекуррентных позициях соматического мутагенеза (хотспоты) (в соответствии с [Ivanov et al., 2019])
- Coverage – среднее покрытие целевого региона
- EvennessScore – равномерность покрытия (в соответствии с [Konrad Oexle, 2016])
- MAPD – равномерность покрытия (медиана абсолютных парных отклонений покрытия соседних ампликонов)
- CoveragePool1 - среднее покрытие целевого региона пула 1 (для двухпульных панелей)
- EvennessScorePool1 - равномерность покрытия пула 1 (в соответствии с [Konrad Oexle, 2016]) (для двухпульных панелей)
- MAPDPool1 - равномерность покрытия пула 1 (медиана абсолютных парных отклонений покрытия соседних ампликонов) (для двухпульных панелей)
- CoveragePool2 - среднее покрытие целевого региона пула 2 (для двухпульных панелей)
- EvennessScorePool2 - равномерность покрытия пула 2 (в соответствии с [Konrad Oexle, 2016]) (для двухпульных панелей)
- MAPDPool2 - равномерность покрытия пула 2 (медиана абсолютных парных отклонений покрытия соседних ампликонов) (для двухпульных панелей)

* в случае, если образец не прошел контроль качества данных, а КО образец в запуске прошел контроль качества, рекомендуется повторить исследование на другом биологическом материале этого же пациента.

SampleID	SampleName	Specimen	Panel	RESULT	TotalRead	ReadsPool	ReadsPool	OnTargetF	Uniformity	SensGerml	SensGerml	SensSoma	SensSoma	Coverage	EvennessS	MAPD	CoverageF	EvennessS	MAPDPool	CoverageF	EvennessS	MAPDPool2
18711-01	OncoAtlas	WB	AODHRD1	FAIL	51676	22686	28733	0.98	0.57	0.91	0.86	NA	NA	67	0.4151314	1.937	59	0.4249206	1.812	75	0.4092014	2.235
20121-01	OncoAtlas	WB	AODABCV	PASS	385382	186816	193070	0.97	0.99	1.00	1.00	NA	NA	733	0.8560459	0.302	720	0.8502949	0.307	745	0.8628531	0.263
37551-01	OncoAtlas	WB	UNKNOWN	FAIL	468	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
58951-01	OncoAtlas	WB	AODHRD1	PASS	987025	477546	514746	0.96	0.98	1.00	1.00	NA	NA	1293	0.8255651	0.233	1244	0.8366513	0.23	1342	0.8158163	0.278
62293-01	OncoAtlas	FFPE	AODABCV	PASS	374608	168790	194037	0.95	0.98	NA	NA	1.00	1.00	700	0.8607682	0.321	650	0.8611227	0.278	751	0.8663539	0.26
67067-01	OncoAtlas	WB	AODHRD1	PASS	985831	491511	496838	0.97	0.98	1.00	1.00	NA	NA	1286	0.8173383	0.247	1280	0.8319845	0.221	1293	0.8024197	0.256

Рисунок 15. Пример таблицы с результатами (лист «QC»)

Для образцов, которые не проходят контроль качества данных, последующий анализ данных (включая детектирование молекулярных альтераций и интерпретация результатов) не проводится.

На листе «result» книги EXCEL приводятся результаты детектирования молекулярных альтераций. Приводятся все типы обнаруженных альтераций, включая: SNV, MNV, indel, CNV, MSI (в зависимости от назначения набора реагентов). Указываемые технические характеристики детектирования молекулярных альтераций включают: AD (количество чтений альтернативного аллеля – только для SNV/MNV/indel), DP (общее покрытие сайта варианта – только для SNV/MNV/indel/CNV), VAF (частота альтернативного аллеля после коррекции – только для SNV/MNV/indel), CN (количество копий гена – только для CNV). На листе «result» приводятся только клинически значимые варианты (в соответствии с назначением набора реагентов, а также в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ).

SampleID	SampleName	Gene	Significan	Origin	AD	DP	AF	Consequ	HGVSc	HGVSp	Transcript	dbSNP	COSMIC	GNOMAD	TOPMED	ExAC	spliceAI	CADD	PROVEAN	SIFT	MutPred	MetaLR
58951-01	OncoAtlas	CDK12	damaging	germline	396	1293	0.318	stop_gain	chr17:376	c.1952C>G	p.Ser651T	ENST00000447079	-	0-	-	N	D	-	-	-	-	
58951-01	OncoAtlas	CDK12	damaging	germline	484	1084	0.4491	frameshift	chr17:376	c.2309_23	p.Thr770S	ENST00000447079	-	0-	-	N	-	-	-	-	-	
58951-01	OncoAtlas	CHEK2	damaging	germline	474	652	0.7187	splice_doi	chr22:291	c.573+1G>	-	ENST000001219086	COSV6042	0,0001	6,37E-05	0,000107	D	N	-	-	N	
20121-01	OncoAtlas	BRCA1	damaging	germline	276	655	0.4271	stop_gain	chr17:412	c.4752C>G	p.Tyr1584	ENST0000018035743	-	3,99E-06	7,96E-06	-	N	D	-	-	-	
62293-01	OncoAtlas	PALB2	damaging	germline	377	700	0.5294	frameshift	chr16:236	c.1958_19	p.Cys653T	ENST00000261584	-	0-	-	N	-	-	-	-	-	

Рисунок 16. Пример таблицы с результатами (лист «result»)

Отчеты по каждому образцу можно скачать с помощью кнопки «скачать все отчеты». В каждом отчете есть разделы:

1. Заключение;
2. Приложение.

В разделе «Заключение» есть подразделы «Сводная Информация»; «Результат» (Положительный результат означает обнаружение одной или более молекулярной альтерации, которая является клинически значимой в соответствии с назначением набора реагентов, а также клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ); «Статус микросателлитной нестабильности» (приводится только если обнаружение микросателлитной нестабильности входит в назначение набора реагентов (см. раздел «Описание и назначение»)); «Обнаруженные генетические варианты» – указываются только клинически значимые генетические варианты в соответствии с назначением набора реагентов, а также клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ (указываются как маркеры чувствительности к терапии, так и патогенные генетические варианты, ассоциированные с развитием наследственного онкологического синдрома; в разделе указываются следующие типы молекулярных альтераций: SNV/MNV/indel/CNV); «Интерпретация результата» (приводятся наименования МНН препаратов в соответствии с обнаруженными предиктивными маркерами); «Качество данных».

В разделе «Приложение» указываются все обнаруженные молекулярные альтерации, которые не являются клинически значимыми в соответствии с назначением набора реагентов, а также клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ, что включает: значимые риск-факторы развития онкологических заболеваний; фармакогенетические маркеры; драйверные соматические варианты.

Настройки генерации отчета доступны в профиле пользователя:

Залустить анализ данных

Лаборант Ольга Давыдовна [Перейти в профиль](#)

Заявки на тестирование Образцы Анализ данных

Дата запуска анализа	Дата секвенирования	Платформа	Статус	Всего образцов	Прошли QC	Версия пайплайна	
21.12.2023	15.12.2023	Helicon	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮
18.12.2023	15.12.2023	Helicon	Интерпретация результатов	17	9	2.12	
05.12.2023	24.11.2023	Illumina MiSeq	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮
30.11.2023	24.11.2023	GeneMind GenoLab M	Анализ завершен	2	2	2.1	⋮
28.11.2023	04.11.2023	Helicon	Анализ завершен	1	1	2.12	⋮

⌵ Скачать все отчеты
⌵ Скачать таблицу с результатами

« ← назад » « предыдущий » 1-5 из 5 « дальше » « следующий » »

30 ▾ результатов на страницу

Рисунок 17. Переход в профиль пользователя для настройки генерации отчета

- 5 Просмотр результатов анализа отдельного образца. Список проанализированных образцов доступен на вкладке «Образцы» главной страницы:

Новый анализ | Аналитика | [Перейти в профиль](#)

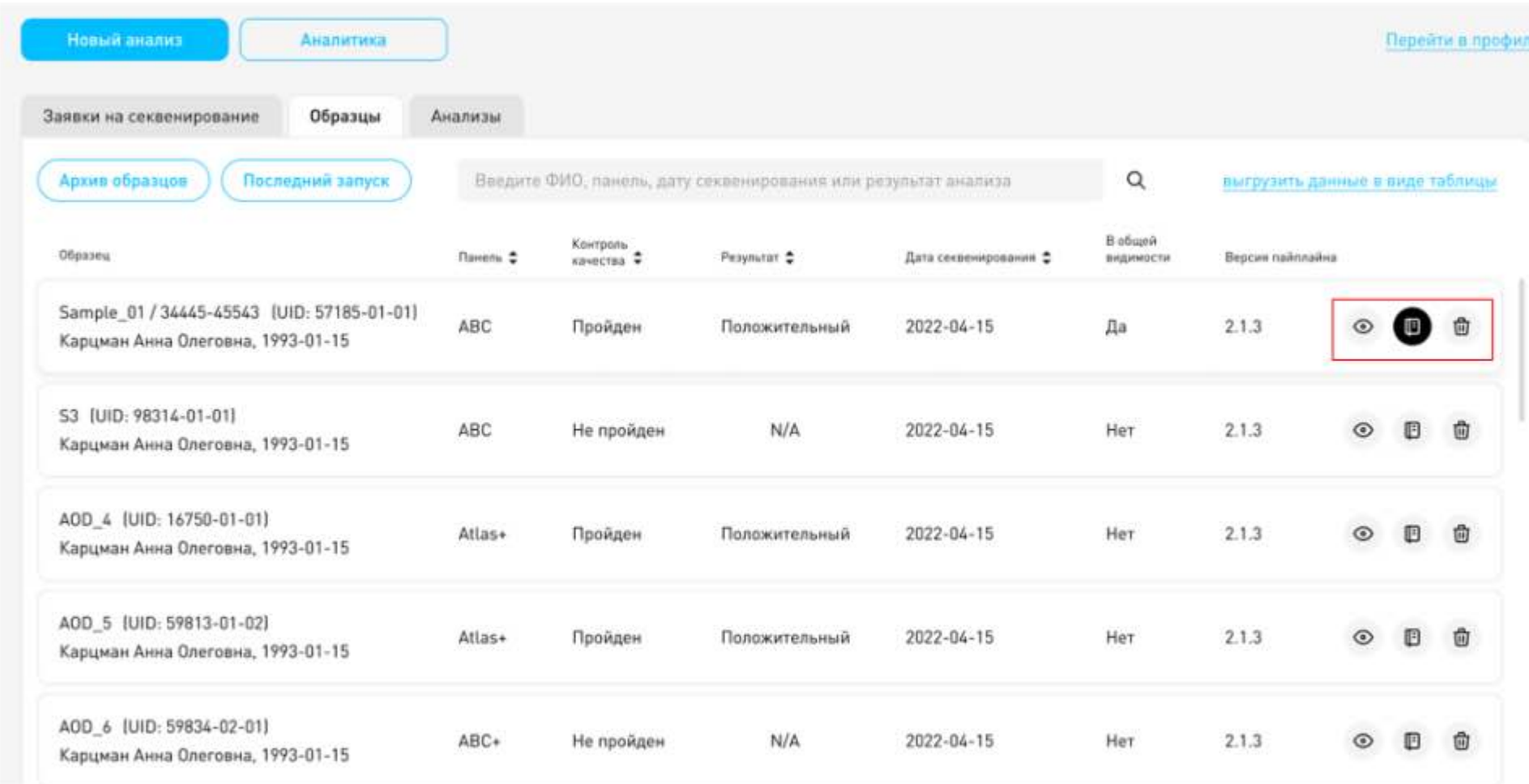
Заявки на секвенирование | **Образцы** | Анализы

Архив образцов | Последний запуск | Введите ФИО, панель, дату секвенирования или результат анализа | [выгрузить данные в виде таблицы](#)

Образец	Панель	Контроль качества	Результат	Дата секвенирования	В общей видимости	Версия пайплайна	
Sample_01 / 34445-45543 (UID: 57185-01-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	ABC	Пройден	Положительный	2022-04-15	Да	2.1.3	
S3 (UID: 98314-01-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	ABC	Не пройден	N/A	2022-04-15	Нет	2.1.3	
AOD_4 (UID: 16750-01-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	Atlas+	Пройден	Положительный	2022-04-15	Нет	2.1.3	
AOD_5 (UID: 59813-01-02) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	Atlas+	Пройден	Положительный	2022-04-15	Нет	2.1.3	
AOD_6 (UID: 59834-02-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	ABC+	Не пройден	N/A	2022-04-15	Нет	2.1.3	

Рисунок 18. Вид списка проанализированных образцов

Скачать отчет в формате .pdf по отдельному образцу можно с помощью иконки «книга». Для перемещения образца в архив необходимо нажать иконку «корзина» (при переходе в архив образцов можно либо восстановить образец из архива, либо удалить его окончательно). Для детального просмотра и редактирования результатов анализа по образцу необходимо нажать иконку «глаз».



Новый анализ Аналитика [Перейти в профиль](#)

Заявки на секвенирование **Образцы** Анализы

Архив образцов Последний запуск Введите ФИО, панель, дату секвенирования или результат анализа [выгрузить данные в виде таблицы](#)
















Образец	Панель	Контроль качества	Результат	Дата секвенирования	В общей видимости	Версия пайплайна	
Sample_01 / 34445-45543 (UID: 57185-01-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	ABC	Пройден	Положительный	2022-04-15	Да	2.1.3	  
S3 (UID: 98314-01-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	ABC	Не пройден	N/A	2022-04-15	Нет	2.1.3	  
A0D_4 (UID: 16750-01-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	Atlas+	Пройден	Положительный	2022-04-15	Нет	2.1.3	  
A0D_5 (UID: 59813-01-02) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	Atlas+	Пройден	Положительный	2022-04-15	Нет	2.1.3	  
A0D_6 (UID: 59834-02-01) Карцман Анна Олеговна, 1993-01-15	ABC+	Не пройден	N/A	2022-04-15	Нет	2.1.3	  

Рисунок 19. Возможные опции работы с результатом анализа отдельного образца: «книга» - скачать отчет в формате .pdf, «корзина» - перемещение образца в архив, «глаз» - детальный просмотр и редактирование результата анализа

Детальный просмотр результатов анализа образца позволяет редактировать результаты детектирования генетических вариантов, интерпретацию результатов, скачать результаты в формате .bam, просмотреть результаты в Genome Browser, а также редактировать информацию по образцу/пациенту с последующим обновлением генерируемого отчета.

[Обратно к списку результатов](#) [Перейти в профиль](#)

Контроль качества пройден **Панель: Solo Atlas+**
Анализ качества данных | Анализ горячих точек | [скачать .bam](#) Секвенирование на Illumina NextSeq, 2022-04-14

SNV/indel
 CNV
 соматические
 наследственные
 клинически незначимые
 артефакты

[Настроить выборку SNV/indel](#) 🔍

Значимость	Ген	MAF	VAF/CN	PVAL
GoF/D/L1	BRAF <small>соматический</small> chr7:142453126A>T (hg19) / миссенс ENST00000288402:p.Val600Glu ENST00000288402:c.1799T>A	3.9e-6%	34%	2636
L1	Микросателлитная нестабильность			2605
LoF/D	TP53 <small>соматический</small> chr17:75793720>GC (hg19) / фреймшифт ENST00000269305:p.Ser106GlnfsTer43 ENST00000269305:c.314dup	0	10%	3234
LoF/D	PTEN <small>соматический</small> chr10:89485270G>GT (hg19) / фреймшифт ENST00000371953:p.Leu57PhefsTer6 ENST00000371953:c.170dup	0	13%	6358
LoF/D	PTEN <small>соматический</small> chr10:89492819C>CA (hg19) / фреймшифт ENST00000371953:p.Pro103ThrfsTer4 ENST00000371953:c.306dup	0	14%	3575

Sample_01
 Карцман Анна Олеговна, Ж, 1993-01-15
 Тип образца: FFPE
 Заболевание: Колоректальный рак
 Дата исследования: 2022-04-14 Дата забора материала: неизвестно
 Источник биоматериала: кишка Маркировка материала: 27243/A22
 Диагноз: C20 Рак прямой кишки, умеренно-дифференцированная аденокарцинома T4N0M0, IIB тсadia.

[Редактировать](#) [Генерация отчета](#) [Отправить врачу](#)

Предиктивный маркер: M3 Pф [L1] **Драйверный вариант [D]**

Природа варианта: **соматический**
 Эффект варианта: **активирующий [GoF]**
 VAF - 34% (AD - 3408; DP - 10021), Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT	CADD	MutPred	spliceAI
rs113488022	C05V56056643	3.9e-6%	D	D	N	N

окружение варианта (hg19) GGGCTAGTACGAACTCTAGGCTATCCCGATCCAG
 ампликоны

[Подробнее результаты коллинга](#) [Смотреть в IGV](#)
[Смотреть в genome browser](#)

[Изменить интерпретацию](#)

Рисунок 20. Пример детального просмотра результатов анализа образца

Редактирование информации по образцу/пациенту доступно в правой верхней панели с помощью кнопки «Редактировать». В открывшемся окне необходимо обновить информацию и нажать кнопку «Сохранить». Введенные данные будут отображены в отчете после его новой генерации.

The screenshot displays a web interface for genomic analysis results. On the left, a table lists variants with columns for significance, gene, MAF, VAF/CN, and PVAL. The top variant, BRAF, is highlighted with a red box. On the right, a detailed panel for 'Sample_01' shows patient information, sample type, and a list of buttons: 'Редактировать', 'Генерация отчета', and 'Отправить врачу'. The 'Редактировать' button is highlighted with a red box.

Контроль качества пройден | [Анализ качества данных](#) | [Анализ горячих точек](#) | [скачать .bam](#) | **Панель: Solo Atlas+** | Секвенирование на Illumina NextSeq, 2022-04-14

SNV/indel | CNV | соматические | наследственные | клинически незначимые | артефакты

[Настроить выборку SNV/indel](#) | Введите ген или вариант

Значимость	Ген	MAF	VAF/CN	PVAL
GoF/D/L1	BRAF соматический	3.9e-6%	34%	2636
L1	Микросателлитная нестабильность			2605
LoF/D	TP53 соматический	0	10%	3234
LoF/D	PTEN соматический	0	13%	6358
LoF/D	PTEN соматический	0	14%	3575

Sample_01
Карцман Анна Олеговна, Ж, 1993-01-15
Тип образца: FFPE
Заболевание: Колоректальный рак
Дата исследования: 2022-04-14 | Дата забора материала: неизвестно
Источник биоматериала: кишка | Маркировка материала: 27243/A22
Диагноз: C20 Рак прямой кишки, умеренно-дифференцированная аденокарцинома T4aN0M0, IIВ стадия.

[Редактировать](#) | [Генерация отчета](#) | [Отправить врачу](#)

Предиктивный маркер: M3 РФ [L1] | **Драйверный вариант [D]**
Природа варианта: соматический
Эффект варианта: активирующий [GoF]
VAF - 34% (AD - 3408; DP - 10021); Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT	CADD	MutPred	spliceAI
rs113488022	COSV56056643	3.9e-6%	D	D	N	N

окружение варианта [hg19] | GGGCTCTAGTTACGAACTCTAGGTCTATCCCGATCCA0
ампликоны

[Подробные результаты коллинга](#) | [Смотреть в IGV](#)
[Смотреть в genome browser](#)

[Изменить интерпретацию](#)

Рисунок 21. Переход к редактированию результатов анализа образца (выделен красной рамкой)

Обратно к списку результатов
✕

Контроль качества пройден

[Анализ качества данных](#)
[Анализ геномных точек](#)

Показать артефакты Показать нейтральные варианты [Настроить выборку вариантов](#)

Введите ген или вариант 🔍

Значимость	Ген	Вариант	P-value	VAF	MAF
D	BRCA1	chr17:g124358427-c; ENSP00000418940.2:plus654SerfsTer47; ENST000000417181.2:c.1961del	150	34%	0.003%
N/A	BRCA1	chr17:g124358427-c; ENSP00000418940.2:plus654SerfsTer47; ENST000000417181.2:c.1961del	310	12%	0.31%
VUS	ATM	chr11:g174598427-c; ENSP00000418940.2:plus654SerfsTer47; ENST000000417181.2:c.1961del	150	54%	12%
D	BRCA1	chr17:g124358427-c; ENSP00000418940.2:plus654SerfsTer47; ENST000000417181.2:c.1961del	12	9%	N/A

Информация об образце/пациенте

Основная информация

Фамилия:

Имя:

Отчество:

Идентификатор образца/пациента:

Пол: Мужской Женский

Дата рождения:

Информация о биологическом образце

Тип биологического образца:

Место (орган) забора материала:

Маркировка материала:

Дата забора материала (год, число):

Дата забора материала (месяц, число):

Дата забора материала (день, число):

Рисунок 22. Окно изменения информации об образце или пациенте

В основной таблице приведены все обнаруженные молекулярные альтерации, включая SNV/MNV/indel/CNV/MSI (типы детектируемых молекулярных альтераций могут зависеть от назначения набора реагентов). В колонке «значимость» приведена клиническая и биологическая значимость каждой молекулярной альтерации:

- [L1]: молекулярная альтерация является предиктивным маркером в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ
- [P]: генетический вариант ассоциирован с наследственным опухолевым синдромом
- [L2]: молекулярная альтерация является предиктивным маркером, который не входит в клинические рекомендации Министерства Здравоохранения РФ, но входит в международные рекомендации NCCN/ESMO/ASCO или имеет значимость I-III уровня в соответствии с системой уровней доказательности ESCAT
- [PgX]: генетический вариант ассоциирован с токсичностью противоопухолевой терапии или незначимым снижением её эффективности (фармакогенетический маркер)
- [R]: генетический вариант не ассоциирован с развитием наследственного опухолевого синдрома, но приводит к статистически-значимому повышению риска онкологических заболеваний (риск-фактор)
- [D]: молекулярная альтерация потенциально является (или может являться) драйверным событием в канцерогенезе (относится к повреждающим вариантам в генах опухолевой супрессии или активирующим вариантам в онкогенах)
- [GoF]: молекулярная альтерация приводит к значительному повышению активности продукта гена (активирующий вариант / gain of function).
- [LoF]: молекулярная альтерация приводит к значительному снижению активности продукта гена (повреждающий вариант / loss of function).
- [N]: молекулярная альтерация не приводит к изменению активности продукта гена

В колонке «Ген» также указывается потенциальная природа молекулярной альтерации (наследственный/соматический). Определение природы молекулярной альтерации осуществляется в случае, если анализом является ДНК, выделенная из биологического материала, в котором могут обнаруживаться соматические варианты (FFPE/PLASMA). Анализ проводится с помощью методов машинного обучения на основании нескольких параметров, среди которых:

- Наличие варианта в базах данных наследственных генетических вариантов и соматических мутаций, а также популяционная частота генетического варианта в случае, если ранее он уже был обнаружен в рамках крупных геномных проектов
- Частота обнаружения варианта в образцах FFPE и цельной крови по аккаунту
- Частота альтернативного аллеля конкретного варианта в чтениях, покрывающих сайт варианта
- Частота альтернативного аллеля близлежащих полиморфизмов
- Вероятность полной делеции гена (LoH) в части опухолевых клеток

- Вероятность происхождения конкретной нуклеотидной замены в соматическом или наследственном статусе
- Априорная вероятность обнаружения соматического или наследственного повреждающего (или активирующего) варианта в конкретном генетических
- Частота альтернативного аллеля прочих достоверно соматических и достоверно наследственных генетических вариантов в опухолевом образце

В случае, если по результатам биоинформатического анализа вариант с вероятностью 95% и более является наследственным, то в результатах анализа будет отмечено, что вариант является наследственным. В случае, если по результатам биоинформатического анализа вариант с вероятностью 95% и более является соматическим, то в результатах анализа будет отмечено, что вариант является соматическим. В остальных случаях в результатах анализа будет отмечено, что наследственную/соматическую природу варианта достоверно определить нельзя.

В случае, если для пациента ранее уже были получены данные секвенирования крови, автоматически проводится сопоставление обнаруженных ранее в крови генетических вариантов и природа варианта определяется достоверно на основании сравнения с нормальной тканью. Достоверность определения природы варианта отображается в генерируемом отчете формата .pdf.

Наличие иконки «огонь» рядом с природой варианта в колонке «Ген» означает, что вариант является мутацией основателя (для наследственных вариантов) или располагается в позиции рекуррентного соматического мутагенеза / хотспот вариант (для соматических вариантов).

Обратно к списку результатов [Перейти в профиль](#)

Контроль качества пройден **Панель: Solo Atlas+**
Анализ качества данных | Анализ гетерозиготности | Скачать BAM Секвенирование на Illumina NextSeq, 2022-04-14

SNV/indel
 CNV
 соматические
 наследственные
 клинически незначимые
 артефакты

[Настроить выборку SNV/indel](#) 🔍

Значимость	Ген	MAF	VAF/CN	PVAL
GoF/D/L1	BRAF <small>соматический</small> chr7:140453134A>T [hg19] / миссенс ENST00000288602.p.Val600Glu ENST00000288602.c.1799T>A	3.9e-6%	34%	2636
L1	Микросателлитная нестабильность			2605
LoF/D	TP53 <small>соматический</small> chr17:75793720>GC [hg19] / фрейншифт ENST00000269305.p.Ser104GlnfsTer43 ENST00000269305.c.314dup	0	10%	3234
LoF/D	PTEN <small>соматический</small> chr10:89485700>GT [hg19] / фрейншифт ENST00000371953.p.Leu57PhefsTer6 ENST00000371953.c.170dup	0	13%	6358
LoF/D	PTEN <small>соматический</small> chr10:89492819C>CA [hg19] / фрейншифт ENST00000371953.p.Pro103ThrfsTer4 ENST00000371953.c.306dup	0	14%	3575

Sample_01
 Карцан Анна Олеговна, Ж, 1993-01-15
 Тип образца: FFPE
 Заболевание: Колоректальный рак
 Дата исследования: 2022-04-14
 Источник биоматериала: кишка
 Дата забора материала: неизвестно
 Маркировка материала: 27243/A22
 Диагноз: C20 Рак прямой кишки, умеренно-дифференцированная аденокарцинома T6aN0M0, IIВ стадия.

[Редактировать](#) [Генерация отчета](#) [Отправить врачу](#)

Предиктивный маркер: M3 РФ [L1] **Драйверный вариант [D]**

Природа варианта: **соматический**
 Эффект варианта: **активирующий [GoF]**
 VAF - 34% (AD - 3408; DP - 10021); Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT	CADD	MutPred	spliceAI
rs113488077	COSV56056643	3.9e-6%	D	D	N	N

окружение варианта [hg19] **GGGCTCTAGTTACGAACTCTAGGTCTATCCCGATCCAG**
 ампликоны

[Подробные результаты коллинга](#) [Смотреть в IGV](#)
[Смотреть в genome browser](#)

[Изменить интерпретацию](#)

Рисунок 23. Пример обозначения символом «огонь» варианта-мутации основателя (для наследственных вариантов) или варианта, расположенного в позиции рекуррентного соматического мутагенеза / хотспот вариант (для соматических вариантов)

Панель фильтрации молекулярных альтераций позволяет отобразить варианты, которые будут отображены в основной таблице

[Обратно к списку результатов](#)
[Перейти в профиль](#)

Контроль качества пройден

[Анализ качества данных](#) [Анализ горячих точек](#) [скачать .bam](#)

Панель: Solo Atlas+
Секвенирование на Illumina NextSeq, 2022-04-14

SNV/indel
 CNV
 соматические
 наследственные
 клинически незначимые
 артефакты

[Настроить выборку SNV/indel](#)

GoF/D/L1	BRAF <small>соматический</small>	chr7:140453136A>T (hg19) / миссенс ENST00000288602.p.Val600Gln ENST00000288602.c.1799T>A	3.9e-6%	34%	2636
L1	Микросателлитная нестабильность			2605	
LoF/D	TP53 <small>соматический</small>	chr17:75792720>GC (hg19) / фреймшифт ENST00000269305.p.Ser106GlnfsTer43 ENST00000269305.c.314dup	0	10%	3234
LoF/D	PTEN <small>соматический</small>	chr10:89482700>GT (hg19) / фреймшифт ENST00000371953.p.Leu57PhefsTer6 ENST00000371953.c.170dup	0	13%	6358
LoF/D	PTEN <small>соматический</small>	chr10:89482819C>CA (hg19) / фреймшифт ENST00000371953.p.Pro103ThrfsTer4 ENST00000371953.c.306dup	0	14%	3575

Sample_01

Карцман Анна Олеговна, Ж, 1993-01-15

Тип образца: FFPE

Заболевание: Колоректальный рак

Дата исследования: 2022-04-14 Дата забора материала: неизвестно

Источник биоматериала: кишка Маркировка материала: 27243/A22

Диагноз: C20 Рак прямой кишки, умеренно-дифференцированная аденокарцинома T4aN0M0, IV стадия.

[Редактировать](#)
[Генерация отчета](#)
[Отправить врачу](#)

Предиктивный маркер: M3 P9 [L1] **Драйверный вариант [D]**

Природа варианта: **соматический**

Эффект варианта: **активирующий (GoF)**

VAF - 34% (AD - 3408; DP - 10021); Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT	CADD	MutPred	spliceAI
rs113488022	COSV54056443	3.9e-6%	D	D	N	N

окружение варианта (hg19) GGGCTCTAGTTACGAACTCTAGGTCATCCCGATCCAG

ампликоны

[Подробные результаты коллинга](#) [Смотреть в IGV](#)

[Смотреть в genome browser](#)

Изменить интерпретацию

Рисунок 24. Панель фильтрации молекулярных альтераций (обозначена красной рамкой)

Нажатие на строку конкретной молекулярной альтерации в основной таблице позволяет просмотреть детальную информацию по качеству детектирования этого варианта, а также его аннотацию в правой нижней панели.

[Обратно к списку результатов](#) [Перейти в профиль](#)

Контроль качества пройден **Панель: Solo Atlas+**
Анализ качества данных | Анализ сортировки | [скачать .bam](#) Секвенирование на Illumina NextSeq, 2022-04-14

SNV/indel
 CNV
 соматические
 наследственные
 клинически незначимые
 артефакты

[Настроить выборку SNV/indel](#)

Значимость	Ген	MAF	VAF/CN	PVAL
GoF/D/L1	BRAF chr7:140453136A>T (hg19) / миссенс ENST00000288602:p.Val600Glu ENST00000288602:c.1799T>A <small>соматический</small>	3.9e-6%	34%	2636
L1	Микросателлитная нестабильность			2605
LoF/D	TP53 chr17:75793720>GC (hg19) / фрейншифт ENST00000269305:p.Ser106GlnfsTer43 ENST00000269305:c.314dup <small>соматический</small>	0	10%	3234
LoF/D	PTEN chr10:896852700>GT (hg19) / фрейншифт ENST00000371953:p.Leu57PhefsTer6 ENST00000371953:c.170dup <small>соматический</small>	0	13%	6358
LoF/D	PTEN chr10:896852819C>CA (hg19) / фрейншифт ENST00000371953:p.Pro103ThrfsTer4 ENST00000371953:c.306dup <small>соматический</small>	0	14%	3575

Предиктивный маркер: M3 PF (L1) **Драйверный вариант (D)**

Природа варианта: **соматический**
 Эффект варианта: **активирующий (GoF)**
 VAF - 34% (AD - 3408; DP - 10021); Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT	CADD	MutPred	spliceAI
rs113488022	COSV56056643	3.9e-4%	D	D	N	N

окружение варианта (hg19) **GGGCTCTAGTACGAACTCTAGGTCTATCCCGATCCAG**
 ампликоны

[Подробнее результаты коллинга](#) [Смотреть в IGV](#)
[Смотреть в genome browser](#)

[Изменить интерпретацию](#)

Рисунок 25. Пример детальной информации о качестве детектирования варианта и его аннотация (выделены красной рамкой)

Нажатие кнопки «Изменить интерпретацию» в правой нижней панели позволяет изменить природу варианта (наследственный / соматический / артефакт) и биологический эффект вариант (LoF/GoF/N). После выбора новых значений необходимо нажать кнопку «сохранить». В основной таблице с помощью панели фильтрации молекулярных альтераций можно отобразить кандидаты в генетические варианты, которые по результатам биоинформатического анализа были признаны артефактами. Изменение природы варианта с «артефакт» на «наследственный»/«соматический» и обратно позволяет редактировать результаты детектирования генетических вариантов. После внесения изменений необходимо нажать кнопку «Генерация отчета» в правой верхней панели для того, чтобы сформировать новый отчет в соответствии с введенными изменениями в результаты детектирования генетических вариантов и/или их интерпретации.

Предиктивный маркер: M3 РФ [L1]
Ассоциирован с НОС [P]

Природа варианта наследственный (гетерозигота) ▼

Эффект варианта повреждающий [LoF] ▼

VAF - 34% [AD - 3408; DP - 10021]; Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT4G	CADD	MutPred	CHASM
rs12381264	COSV63186428 (CNT = 6240)	0.003%	D	D	D	D

окружение варианта (hg19) GGGCTCTAGTTACGAACTCTAGGTCTATCCCGATCCAG

ампликоны

[Подробные результаты коллинга](#)
[Смотреть в IGV](#)

[Смотреть в genome browser](#)

Отмена

Сохранить

Рисунок 26. Пример окна с детальной информацией о качестве детектирования варианта и его аннотацией в режиме редактирования

Детальный просмотр результатов анализа качества данных доступен в левой верхней панели.

[Обратно к списку результатов](#) [Перейти в профиль](#)

Контроль качества пройден **Панель: Solo Atlas+**

[Анализ качества данных](#) [Анализ сборки генома](#) [скачать .bam](#) Секвенирование на Illumina NextSeq, 2022-04-14

SNV/indel CNV соматические наследственные клинически незначимые артефакты

[Настроить выборку SNV/indel](#) 🔍

Значимость	Ген	MAF	VAF/CN	PVAL
GoF/D/L1	BRAF соматический chr7:146453136A>T (hg19) / миссенс ENST00000288602.p.Val600Glu ENST00000288602.c.1799T>A	3.9e-6%	34%	2636
L1	Микросателлитная нестабильность			2605
LoF/D	TP53 соматический chr17:75793725>GC (hg19) / фреймшифт ENST00000269305.p.Ser104GlnfsTer43 ENST00000269305.c.314dup	0	10%	3234
LoF/D	PTEN соматический chr10:896852700>GT (hg19) / фреймшифт ENST00000371953.p.Leu57PhefsTer6 ENST00000371953.c.170dup	0	13%	6358
LoF/D	PTEN соматический chr10:896926190>CA (hg19) / фреймшифт ENST00000371953.p.Pro103ThrfsTer4 ENST00000371953.c.306dup	0	14%	3575

Sample_01
Карцман Анна Олеговна, Ж, 1993-01-15
Тип образца: FFPE
Заболевание: Колоректальный рак
Дата исследования: 2022-04-14
Источник биоматериала: кишка
Дата забора материала: неизвестно
Маркировка материала: 27243/A22
Диагноз: C20 Рак прямой кишки, умеренно-дифференцированная аденокарцинома T4aN0M0, IIВ стадия.

[Редактировать](#) [Генерация отчета](#) [Отправить врачу](#)

Предиктивный маркер: M3 РФ (L1) **Драйверный вариант (D)**

Природа варианта: **соматический**
Эффект варианта: **активирующий (GoF)**
VAF - 34% (AD - 3408; DP - 10021); Частота в моих образцах - 1% (10 / 1021)

dbSNP	COSMIC	GNOMAD	SIFT	CADD	MutPred	spliceAI
rs113488022	COSV56056643	3.9e-6%	D	D	N	N

окружение варианта (hg19) **GGGCTTAGTTACGAACTCTAGGTCTATCCCGATCCAG**
ампликоны

[Подробные результаты коллинга](#) [Смотреть в IGV](#)
[Смотреть в genome browser](#)

[Изменить интерпретацию](#)


Рисунок 27. Пример детального просмотра результатов анализа качества данных (выделен красной рамкой)

- После завершения работы ПО «Solo AVES» результаты анализа сохраняются в виде отчетов формата .pdf по каждому образцу. Каждый отчет по отдельному образцу будет иметь название вида SampleName.pdf, где SampleName - имя образца, указанное при его добавлении в окне «запустить анализ данных». Открыть отчет по образцу можно с помощью любой программы для просмотра .pdf файлов (например, Adobe Acrobat Reader версии 22 и выше).

7 В отчете по каждому образцу указывается информация об обнаруженных генетических вариантах в регионах генов BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, PIK3CA (см. рисунок 28), а также информация о контрольных метриках качества набора прочтений, включая такие показатели как: интегральная расчетная чувствительность детектирования рекуррентных генетических вариантов, равномерность покрытия пула (униформность), средняя глубина покрытия пула.

8 Интерпретация результатов. Результаты считаются валидными, если следующие метрики качества данных секвенирования для каждого исследуемого образца соответствуют заявленным (см. рис.29). Контрольные метрики качества рассчитываются с помощью ПО «Solo AVES» <https://aves.oncoatlas.ru/>, версия 1.03.04 от 04.02.2023, и приводятся в .pdf отчете в разделе «качество данных» (см. рисунок 28).

Рисунок 28. Пример отчета, сгенерированного по результатам анализа данных в ПО «Solo AVES» (Образец №6 из тестового набора данных. Красным выделены основные элементы отчета. В разделе «Обнаруженные генетические варианты» приводится список обнаруженных генетических вариантов. В разделе «Качество данных» приводятся контрольные метрики качества данных высокопроизводительного секвенирования)



Результаты молекулярно-генетического исследования методом NGS

Направляющий врач нет информации	Образец Тип образца: FFPE материал Источник биоматериала: нет информации Дата забора материала: нет информации Идентификатор материала: нет информации	Пациент нет информации Дата рождения: нет информации Заболевание: нет информации
--	---	--

Результат: Положительный

Обнаруженные генетические варианты:

BRCA2	chr13:32914529A>T [hg19] ENST00000380152:c.6537A>T ENST00000380152:p.Lys2013Ter rs80358840	Обнаруживается с частотой альтернативного аллеля 48%
-------	---	---

Описание исследования: Исследование выполнено с помощью набора реагентов "HELICON@ ABC Плюс" (Производитель ООО "ОнкоАтлас", г.Москва)

Качество данных: Биоинформатический контроль качества пройден. Глубина покрытия: 5368x [пул 1 – 5604x, пул 2 – 5132x]; униформность [MAPD]: 1.527 [пул 1 – 1.501; пул 2 – 1.527]; расчетная чувствительность: 100%

Отчет предназначен для использования специалистами в области клинической онкологии и/или генетики

	Интегральная рассчетная чувствительность детектирования рекуррентных генетических вариантов	Равномерность покрытия в пуле (униформность) (максимальное значение)	Средняя глубина покрытия пула (минимальное значение)
Контрольные метрики качества данных секвенирования при анализе образцов ДНК, выделенных из операционного (биопсийного) материала пациента фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE)			
BRCA1	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
BRCA2	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
CHEK2	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
ATM	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
PALB2	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
PIK3CA	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
Контрольные метрики качества данных секвенирования при анализе образцов ДНК, выделенной из плазмы крови пациента ("жидкостная биопсия")			
PIK3CA	не менее 0.99	не более 3	не менее 5000x
Контрольные метрики качества данных секвенирования при анализе образцов ДНК, выделенной цельной крови			
BRCA1	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
BRCA2	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
CHEK2	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
ATM	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x
PALB2	не менее 0.96	не более 3	не менее 5000x

Рисунок 29. Контрольные метрики качества данных секвенирования

VI. Транспортировка и хранение

Наборы реагентов могут транспортироваться всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8°C в течение 6 часов. При более длительной транспортировке наборы должны транспортироваться при температуре от минус 22 до минус 20° (при использовании хладоэлементов (- 20°C)).

Наборы реагентов транспортируются всеми видами крытого транспорта при температуре от минус 22 до минус 20°C при использовании хладоэлементов (- 20°C) в течение суток.

После получения наборы реагентов должны храниться при температуре от минус 22 до минус 20 °C в течение всего срока годности. «Комплект для целевого обогащения ДНК» должен храниться в зоне «пре-ПЦР» (при температуре минус 22 до минус 20°C), а «Комплект для приготовления библиотек ДНК» (при температуре минус 22 до минус 20°C) и «Комплект для циркуляризации библиотек» (при температуре минус 22 до минус 20°C) должны храниться в зоне «пост-ПЦР». Магнитные частицы из комплекта для приготовления библиотек должны храниться при температуре от минус 22 до минус 20°C до первого вскрытия – после него при температуре 2-8°C в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

Приложение 1. Таблица соответствия адаптеров исследуемым образцам.

«HELICON® ABC Плюс С-А», «HELICON® ABC Плюс А»			«HELICON® ABC Плюс С-Б», «HELICON® ABC Плюс Б»		
№ образца	Название образца	Адаптер	№ образца	Название образца	Адаптер
1		Адаптер 1	1		Адаптер 89
2		Адаптер 2	2		Адаптер 90
3		Адаптер 3	3		Адаптер 91
4		Адаптер 4	4		Адаптер 92
5		Адаптер 13	5		Адаптер 93
6		Адаптер 14	6		Адаптер 94
7		Адаптер 15	7		Адаптер 95
8		Адаптер 16	8		Адаптер 96
9		Адаптер 41	9		Адаптер 97
10		Адаптер 42	10		Адаптер 98
1		Адаптер 43	1		Адаптер 99
12		Адаптер 44	12		Адаптер 100
13		Адаптер 45	13		Адаптер 101
14		Адаптер 46	14		Адаптер 102
15		Адаптер 47	15		Адаптер 103
16		Адаптер 48	16		Адаптер 104
17		Адаптер 57	17		Адаптер 121
18		Адаптер 58	18		Адаптер 122
19		Адаптер 59	19		Адаптер 123
20		Адаптер 60	20		Адаптер 124
21		Адаптер 61	21		Адаптер 125
22		Адаптер 62	22		Адаптер 126
23		Адаптер 63	23		Адаптер 127
24		Адаптер 64	24		Адаптер 128
25		Адаптер 65	25		Адаптер 25
26		Адаптер 66	26		Адаптер 26
27		Адаптер 67	27		Адаптер 117
28		Адаптер 68	28		Адаптер 28
29		Адаптер 69	29		Адаптер 29
30		Адаптер 70	30		Адаптер 30
31		Адаптер 71	31		Адаптер 114
32		Адаптер 72	32		Адаптер 32
33		Адаптер 73	33		Адаптер 33
34		Адаптер 74	34		Адаптер 34
35		Адаптер 75	35		Адаптер 35
36		Адаптер 76	36		Адаптер 36
37		Адаптер 77	37		Адаптер 37
38		Адаптер 78	38		Адаптер 38
39		Адаптер 79	39		Адаптер 39
40		Адаптер 80	40		Адаптер 115
41		Адаптер 81	41		Адаптер 49
42		Адаптер 82	42		Адаптер 50
43		Адаптер 83	43		Адаптер 51
44		Адаптер 84	44		Адаптер 52
45		Адаптер 85	45		Адаптер 53
46		Адаптер 86	46		Адаптер 116
47		Адаптер 87	47		Адаптер 55
48		Адаптер 88	48		Адаптер 56

Схема расположения адаптеров в плашке для вариантов исполнения:

«HELICON® ABC Плюс С-А», «HELICON® ABC Плюс А»

	1	2	3	4	5	6
A	01	41	57	65	73	81
B	02	42	58	66	74	82
C	03	43	59	67	75	83
D	04	44	60	68	76	84
E	13	45	61	69	77	85
F	14	46	62	70	78	86
G	15	47	63	71	79	87
H	16	48	64	72	80	88

Схема расположения адаптеров в плашке для вариантов исполнения:

«HELICON® ABC Плюс С-Б», «HELICON® ABC Плюс Б»

	1	2	3	4	5	6
A	89	97	121	25	33	49
B	90	98	122	26	34	50
C	91	99	123	117	35	51
D	92	100	124	28	36	52
E	93	101	125	29	37	53
F	94	102	126	30	38	116
G	95	103	127	114	39	55
H	96	104	128	32	115	56

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 «ОНКОАТЛАС»

Юридический адрес

Российская Федерация, г.Москва, вн.тер.г. Муниципальный Округ Якиманка, пр-кт Ленинский, д. 4, стр. 1А, помещ. 2/2

E-mail

solo@oncoatlas.ru

<http://oncoatlas.ru/abcplum>