

NÁVOD K POUŽITÍ

16, 32, 48 A 96 VZORKŮ

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution



Pro použití v diagnostice in vitro (IVD)
Není určeno pro sebetestování





SOUHRNNÉ INFORMACE

Název produktu	SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution
Typ výrobku	Souhrnné řešení
Řada produktů	Aplikace molekulární diagnostiky (sada + analytika)
ID algoritmu	ILL1XG1G6_CNV
ID panelu genů	HCS v1.1
Verze produktu	1,1
Typ vzorku	Zárodečná DNA izolovaná z periferní krve
Sekvencer	Illumina – MiSeq
Popis GMDN	Sada reagensí IVD / Software pro interpretaci lidské genomové analýzy
ID dokumentu	SG-00671
Verze dokumentu	v9.0
Datum revize	Leden 2026

Tento návod k použití (IFU) platí pro všechny verze SOPHiA DDM™ Dx.
Před použitím tohoto výrobku si důkladně přečtěte příručku s návodem k použití.



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0102ILLCGLL01-016
BS0102ILLCGLL01-032
BS0102ILLCGLL01-048
BS0102ILLCGLL01-096



SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d'Elhuyar
F-64210 Bidart, France





KÓDY PRODUKTŮ

	ÚPLNÝ KÓD PRODUKTU	BOX 1	BOX 2	SADA PRO PŘÍPRAVU KNIHOVNY
REF	BS0102ILLCGLL01-016	B1.01.0002.C-16	B2.0001.C-16	700232
	BS0102ILLCGLL01-032	B1.01.0002.C-32	B2.0001.C-32	700232
	BS0102ILLCGLL01-048	B1.01.0002.C-48	B2.0001.C-48	700234
	BS0102ILLCGLL01-096	B1.01.0002.C-96	B2.0001.C-48	700234



PROHLÁŠENÍ O VYLOUČENÍ ODPOVĚDNOSTI

Tento dokument a jeho obsah jsou majetkem společnosti SOPHiA GENETICS SA a jejích přidružených společností (dále jen „SOPHiA GENETICS“) a jsou určeny výhradně pro smluvní použití zákazníkem v souvislosti s používáním výrobku (výrobků), který(é) je (jsou) zde popsán(y), a pro žádný jiný účel. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen k žádnému jinému účelu a/nebo jinak sdělován, zveřejňován nebo reprodukován, ani na něj nesmí být jakýmkoli způsobem odkazováno bez předchozího písemného souhlasu společnosti SOPHiA GENETICS.

Společnost SOPHiA GENETICS tímto dokumentem nepředává žádnou licenci na základě svých patentových práv, práv k ochranným známkám, autorských práv nebo obecných práv ani podobných práv třetích stran. Pokyny uvedené v tomto dokumentu musí být striktně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a náležitě vyškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaného výrobku (výrobků). Před použitím takového výrobku (výrobků) je nutné si plně přečíst celý obsah tohoto dokumentu a porozumět mu.

POKUD SI NEPŘEČTETE VŠECHNY POKYNY UVEDENÉ V TOMTO DOKUMENTU A NEBUDETE JE VÝSLOVNĚ DODRŽOVAT, MŮŽE TO MÍT ZA NÁSLEDEK POŠKOZENÍ VÝROBKU (VÝROBKŮ), ZRANĚNÍ OSOB, VČETNĚ UŽIVATELŮ NEBO JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU.

SPOLEČNOST SOPHiA GENETICS NEPŘEJÍMÁ ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST ZA NEPŘÍPUSTNÉ POUŽITÍ VÝROBKU (VÝROBKŮ) POPSANÉHO (POPSANÝCH) V TÉTO PŘÍLOZE (VČETNĚ JEJICH ČÁSTÍ NEBO SOFTWARE).

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Illumina® a MiSeq® jsou registrované ochranné známky společnosti Illumina, Inc.

AMPure® a Agencourt® jsou registrované ochranné známky společnosti Beckman Coulter, Inc.

Qubit® a Dynabeads® jsou registrované ochranné známky společnosti Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ je ochranná známka společnosti Roche.

QIAseq® je registrovaná ochranná známka společnosti Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ a SOPHiA DDM™ Dx jsou ochranné známky společnosti SOPHiA GENETICS SA a/nebo jejích přidružených společností v USA a/nebo jiných zemích. Všechny ostatní názvy, loga a jiné ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků. POUŽITÍ ZNAČEK TŘETÍCH STRAN SPOLEČNOSTÍ SOPHiA GENETICS NEZNAMENÁ ŽÁDNÝ VZTAH, SPONZORSTVÍ ANI PODPORU MEZI SPOLEČNOSTÍ SOPHiA GENETICS A VLASTNÍKY TĚCHTO ZNAČEK. Veškeré odkazy společnosti SOPHiA GENETICS na ochranné známky třetích stran slouží k identifikaci odpovídajícího zboží a/nebo služeb třetích stran a jsou považovány za nominativní spravedlivé použití podle zákona o ochranných známkách.



HISTORIE REVIZÍ

ID / VERZE DOKUMENTU	DATUM	Anglická verze odpovídající návodu k použití	POPIS ZMĚNY
SG-00671 – 9.0	Leden 2026	SG-00658 – 11.0	- Změna systému číslování verzí, mezi verzí 8.4 a verzí 9.0 nebyly vydány žádné další verze. - Do tabulky revizní historie byl přidán nový sloupec pro sledování odpovídající anglické verze; sloupec je prázdný pro všechny předchozí revise - Aktualizace názvu komponenty pro přípravu knihovny na SOPHiA GENETICS Library Prep Kit I. - Část 2: Obecné prohlášení o principech a postupu testování zahrnuje shrnutí a vysvětlení testu. - Část 4: Odstranění popisu složek, které nejsou IVD, z rozsahu zařízení. - Výstrahy a Bezpečnostní Opatření: Doplnění identifikace CAS a koncentrace pro každou uvedenou nebezpečnou složku. - Část 6: Odstranění pokynů pro analýzu desktopové aplikace SOPHiA DDM. - Část 7: Odstranění omezení mimo rozsah. - Část 7: Doplnění omezení týkajícího se nesprávného přiřazení indexů. „Webová aplikace SOPHiA DDM™“ změněna na „Režim SOPHiA DDM™ Dx“ - Snížený objem obsahu hybridizačních sond SOPHiA GENETICS z 20 µl na 18 µl (viz část 5.1.1 Obsah sady – BOX 1) - Odstraněno duševní vlastnictví třetích stran z částí 5.1.1 Obsah sady, 5.3.1 Slučování knihoven a 5.3.2 Hybridizace
SG-00671– 8.4	24. září 2025		Aktualizace adresy EC REP
SG-00671 – 8.3	23. května 2025		- Dodatek 1: Tabulka „16 adaptérů s duálním indexem kompatibilních s Illumina® v desce formátu 96 jamek (každá z nich 7 µl)“ byla odstraněna z Dodatku 1 kvůli ukončení tohoto formátu destičky. - Oddíl 5.1.1 Obsah sady – BOX 1: Aktualizováno tak, aby odráželo výše uvedenou změnu.
SG-00671– 8.2	19. března 2025		Oddíl 5.1.1 Obsah sady - BOX 1: 2x hybridizační pufr zvětšený objem z 50 µl na 75 µl; Hybridizační pufr zesilovače - zvětšený objem z 20 µl na 30 µl.
SG-00671 – 8.1	9. ledna 2023		Oprava chyb ve formátování
SG-00671 – 8.0	5. prosince 2022		Oprava různých administrativních chyb



ID / VERZE DOKUMENTU	DATUM	Anglická verze odpovídající návodu k použití	POPIS ZMĚNY
SG-00671– 7.0	2. prosince 2022		- Oddíl 5.1.2 a 5.3.6 – Oprava doplněním vlastního materiálu - Oprava různých administrativních chyb
SG-00671 – 6.0	14. září 2022		- Přidán symbol ochranné známky u SOPHiA DDM a SOPHiA GENETICS - Název Library Prep Kit byl změněn na SOPHiA GENETICS. - Verze dokumentu aktualizována na další celé číslo bez desetinných míst
SG-00671 - 5.5	19. dubna 2022		Přidány pokyny k webové aplikaci SOPHiA DDM™
SG-00671– 5.4	14. dubna 2022		- Omezení a výstrahy: Upraveno - Oprava verzí produktu - Aktualizována adresa kanceláře SOPHiA GENETICS - Změny ve „skutečné laboratoři“ podle celosvětového doporučení - Změny ID dokumentu
ID-60101-15 – 5.3	21. července 2021		- Strana 2, 30 – Drobné změny. - Strana 18 – Změna pořadí kroků. - Strana 27 – Oprava objemu předsměsi PCR „48 vzorků“.
ID-60101-15 – 5.2	16. června 2021		- Strana 3 – Upravena ochranná známka. - Strana 45 – Drobné doplnění ve specifikacích souboru. - Strana 55, 56 – Odstraněn překlep v nadpisu „Unikátní“.
ID-60101-15 – 5.1	28. května 2021		- Strana 2 – Upravena souhrnná informační tabulka. - Strana 3 – Upraveno prohlášení o vyloučení odpovědnosti. - Strana 12, 14, 16, 30 – Upraveno záhlaví tabulky. - Strana 17 – Přehozeno pořadí kroků 1 a 2. - Strana 18 – Příprava ethanolu přesunuta do části „Příprava“. - Strany 13, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 36, 37, 38, 39, 44 – Drobné změny a překlepy. - Strana 21 – bod 1, odrážka 2 – „zesilovač FX Enhancer“ změněno na „reakční předsměs FX“. - Strana 47 – doplněna odrážka 2.
ID-60101-15 – 5.0	30. března 2021		- Titulní strana, logo společnosti, záhlaví, zápatí, poslední strana. - Reorganizace témat. - Zahrnuty pokyny k instalaci, nahrávání a ke konvencím pojmenovávání webové aplikace SOPHiA DDM™ - Sloučen „Návod k použití“ pro čtyři velikosti sady, aby zahrnoval různé - počty vzorků. Zahrnuty tabulky a provedeny příslušné změny, bylo-li to pro tento účel nutné.



ID / VERZE DOKUMENTU	DATUM	Anglická verze odpovídající návodu k použití	POPIS ZMĚNY
			• Byly sloučeny dokumenty „Návodů k použití“ pro následující sady: • PM_CEIVD_B.1.1.19_r3en • PM_CEIVD_B.2.1.1.17_r3en • PM_CEIVD_B.2.1.1.15_r3en • PM_CEIVD_B.2.1.1.26_r2en • Drobné změny pro přehlednost v následujících oddílech: • Oddíl 5.3.1 Slučování knihoven • Oddíl 5.3.5 Promývání streptavidinových kuliček • kodstranění nenavázané DNA



OBSAH

1. Zamýšlené použití / účel	10
2. Obecné informace o zásadě (zásadách) / postupu zkoušky	11
3. Komponenty produktu	12
4. Materiály a metody sady	13
4.1 Počáteční úvahy	13
4.1.1 Obsah sady (16, 32, 48 nebo 96 vzorků).....	13
4.1.2 Potřebný materiál (není součástí dodávky).....	17
4.2 Příprava knihovny	18
4.2.1. Genomická Příprava DNA.....	18
4.2.2 Příprava předsměsí a reagentů	20
4.2.3 Enzymatická fragmentace, koncová oprava End Repair a A-tailing.....	22
4.2.4 Ligace	23
4.2.5 Čištění po ligaci.....	24
4.2.6 Výběr dvojí velikosti	25
4.2.7 Amplifikace knihovny.....	26
4.2.8 Čištění po amplifikaci	28
4.2.9 Kvantifikace a kontrola kvality jednotlivých knihoven	29
4.3 Záchyt	30
4.3.1 Slučování knihoven.....	30
4.3.2 Hybridizace.....	31
4.3.3 Příprava streptavidinových kuliček	33
4.3.4 Navázání hybridizovaných cílů na kuličky	34
4.3.5 Promývání streptavidinových kuliček pro odstranění nenavázané DNA	34
4.3.6 Amplifikace po záchytu	36
4.3.7 Čištění amplifikace po záchytu	37
4.3.8 Konečná kvantifikace a kontrola kvality knihovny	38
4.4. Sekvenování	39
4.4.1 Příprava knihovny pro sekvenování.....	39
5. Postup analýzy	40
5.1 SOPHiA DDM™ Dx Mode Pokyny k instalaci	40
5.2 Popis pracovního postupu analýzy pro generování výsledků IVD.....	40
6. Omezení, výstrahy a bezpečnostní opatření	41
7. Neklinické hodnocení funkční způsobilosti	44
7.1 VLASTNOSTI ANALYTICKÉ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI	44
7.2 METODY.....	44
7.3 DATA (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	46
7.4 OBECNÉ ZÁVĚRY (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	46
7.5 VÝSLEDKY (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)	47
7.6 DOPLŇOVACÍ STUDIE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)	48
7.7 ZÁVĚR	49



8. Symboly	50
9. Podpora	51
Dodatek 1. Desky adaptérů s duálním indexem	52
Dodatek 2. Laboratorní vybavení používané v laboratoři SOPHiA GENETICS	55
Dodatek 3. Obecný pracovní postup – Řešení záchytu SOPHiA DDM™	58
Dodatek 4. Seznam cílových oblastí, použitelných problematických a označených oblastí	60



1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ / ÚČEL

SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) je diagnostický test in vitro určený k identifikaci zárodečných variací vyskytujících se ve 27 nejčastějších genech, které se podílejí na predispozici k rakovině prsu a vaječníků a také k rakovině střev, ve vzorcích zárodečné DNA izolovaných z periferní krve (tabulka 1). SOPHiA DDM™ Dx HCS je analýza využívající sekvenování nové generace (NGS) na přístroji Illumina MiSeq®, která má sloužit jako pomůcka pro zdravotnické pracovníky a poskytnout molekulární zdůvodnění pro klinické rozhodnutí týkající se zárodečných mutací spojených s onemocněními uvedenými v tabulce



2. OBECNÉ INFORMACE O ZÁSADĚ (ZÁSADÁCH) / POSTUPU ZKOUŠKY

Ověřenou funkcí analytiky SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) je analyzovat nezpracovaná data NGS generovaná přístrojem Illumina MiSeq® se sadou reagentů MiSeq® Reagent Kit v3 na zárodečných vzorcích se sadou pro přípravu knihovny SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I (sada QIAseq® FX DNA Library Kit je držitelem OEM licence od společnosti QIAGEN).

SOPHiA DDM™ Dx HCS zahrnuje tři hlavní kroky. Prvním krokem je kvalifikace vzorku DNA, který lze pro test použít. Druhým krokem je ruční příprava vzorků pro sekvenování, která se nazývá příprava knihovny. Příprava knihovny se skládá ze sedmi klíčových kroků: Fragmentace DNA, ligace adaptérů, amplifikace PCR jednotlivých knihoven, slučování knihoven, hybridizace sond, zachycení a amplifikace PCR po zachycení. Třetím postupem je sekvenování připraveného vzorku pomocí chemického postupu SBS (sekvenování syntézou) na sekvenátoru Illumina® MiSeq®.

Pro analýzu je třeba výsledky nahrát do režimu SOPHiA DDM™ Dx a analyzovat pomocí aplikace SOPHiA DDM™ Dx HCS.

Upozorňujeme, že výsledky genetické analýzy musí interpretovat pouze kvalifikovaný odborník v oblasti molekulární genetiky: (například evropský registrovaný klinický laboratorní genetik (ErCLG) certifikovaný Evropskou radou pro lékařskou genetiku (EBMG)).

Následující tabulka uvádí geny, na které cílí řešení SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS) a které se často vyskytují u různých syndromů dědičného nádorového onemocnění.

Tabulka 1: Geny, na které cílí SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution (HCS)

ABRAXAS1	EPCAM	PMS2
APC	MLH1	PMS2CL
ATM	MRE11A	PTEN
BARD1	MSH2	RAD50
BRCA1	MSH6	RAD51C
BRCA2	MUTYH	RAD51D
BRIP1	NBN	STK11
CDH1	PALB2	TP53
CHEK2	PIK3CA	XRCC2



3. KOMPONENTY PRODUKTU

SOPHiA DDM™ Dx HCS se skládá ze dvou složek: sady NGS a bioinformatického pipeline používaného v kombinaci s příslušenstvím IVD, cloudovým režimem SOPHiA DDM™ Dx.

- Účelem sady NGS je připravit a obohatit knihovny DNA z krevních vzorků vhodných pro sekvenování na sekvenátoru Illumina® MiSeq®. Sada NGS umožňuje uživatelům generovat cílená sekvenační data. Prvky jsou popsány v následujícím oddílu 5. Materiály sady a metody – 5.1. Počáteční úvahy – 5.1.1 Obsah sady.
- Bioinformatická pipeline („HCS pipeline“) zpracovává nezpracovaná data NGS pomocí algoritmů schopných posoudit genomickou integritu.
- Režim SOPHiA DDM™ Dx je frontendová webová aplikace dostupná ve formě „software jako služba“ (SaaS), která slouží ke generování zprávy ke stažení pro geny uvedené v tabulce 1 pro zárodečné SNV a INDEL. Platí omezení – viz oddíl 7 – Omezení, výstrahy a bezpečnostní opatření.



4. MATERIÁLY A METODY SADY

4,1 Počáteční úvahy

Pro zjištění optimální účinnosti sady je třeba se po jejím obdržení ubezpečit, že všechny zkumavky jsou fyzicky neporušené a skladované při doporučených teplotách. Nevhodná manipulace s komponentami sady a jejich skladování za jiných podmínek může mít nepříznivý vliv na funkční způsobilost sady.

4.1.1 Obsah sady (16, 32, 48 nebo 96 vzorků)

Před použitím vždy krátkým odstředěním zkumavek zachyťte veškerou tekutinu.

V závislosti na formátu sady jsou k dispozici následující komponenty:

KOMPONENTA	POČET POLOŽEK V ZÁVISLOSTI NA FORMÁTU SADY			
	16 vzorků sada	32 vzorků sada	48 vzorků sada	96 vzorků sada
BOX 1	1	1	1	2 (každý 48 vzorků)
Adaptéry s duálním indexem kompatibilní s Illumina® (v desce formátu 96 jamek, která je součástí balení Box 1)	32	32	48	96 (Deska v jednom ze dvou balení Box 1)
BOX 2	1	1	1	2 (každý 48 vzorků)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (každý 16 vzorků)	1	2 (každý 48 vzorků)

BOX 1 (UCHOVÁVEJTE PŘI TEPLITĚ -25 °C AŽ -15 °C)

- Univerzální blokátory Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Hereditary Cancer Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2x Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10x Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10x Wash Buffer I (160 µl)
- 10x Wash Buffer II (110 µl)
- 10x Wash Buffer III (110 µl)



- V závislosti na formátu sady: 32, 48 nebo 96 adaptérů kompatibilních s Illumina® s duálním indexem v desce formátu 96 jamek (každá z nich 7 µl): viz Dodatek 1 pro zobrazení adaptérů a sekvence.

BOX 2 (UCHOVÁVEJTE PŘI +2 °C AŽ +8 °C)

- Kuličky Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml pro 16 vzorků, 8,7 ml pro 32 vzorků a 11,6 ml pro 48 vzorků, pro 96 vzorků viz Poznámku)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Poznámka: Pro 96 vzorků jsou k dispozici dva boxy 2 po 48 vzorcích (viz tabulka na předchozí stránce).



Důležité: Další podrobnosti naleznete v části Výstrahy a Bezpečnostní opatření níže.

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I* (UCHOVÁVEJTE PŘI TEPLITĚ -25°C AŽ -15°C)

- Pro 32 vzorků jsou k dispozici dvě sady po 16 vzorcích.
- Pro 96 vzorků jsou k dispozici dvě sady po 48 vzorcích.

KOMPONENTY	FORMÁT SADY	
	Sada 16 vzorků	Sada 48 vzorků
Směs HiFi PCR Master Mix 2x (v µl)	500	1560
Amplifikace knihovny Primer Mix Illumina® Library Amp (v µl)	30	95
Směs enzymů FX Enzyme Mix (v µl)	200	625
Pufr FX Buffer 10x (v µl)	100	315
Zesilovač FX Enhancer (v µl)	100	315
DNA ligáza (v µl)	200	625
Pufr DNA ligázy 5x (v µl)	400	1250

* Společnost SOPHiA GENETICS je výhradním distributorem této sady pro přípravu knihovny.

Důležité: Další podrobnosti naleznete v části Výstrahy a Bezpečnostní opatření níže.



VÝSTRAHY A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Název produktu	GHS Piktogram	Prohlášení H&P	Signální slovo	Nebezpečná složka
2X Hybridizační pufr	 	• H300 Při požití může způsobit smrt. • H311 Toxický při styku s kůží. • H315 Dráždí kůži. • H370 Způsobuje poškození orgánů. • H370 Způsobuje poškození orgánů (centrální nervový systém). • H411 Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. • P260 Nevdechujte výpary/aerosoly. • P264 Po manipulaci důkladně omyjte kontaminovanou pokožku. • P270 Při používání tohoto produktu nejezte, nepijte a nekuřte. • P273 Zabraňte uvolnění do životního prostředí. • P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje. • P301+P310 Při požití: Okamžitě volejte toxikologické centrum/lékaře. • P302+P352 Při styku s kůží: Opláchněte velkým množstvím vody. • P308+P311 V případě expozice nebo obav: Zavolejte toxikologické centrum nebo lékaře. • P321 Specifické ošetření (viz lékařské doporučení na tomto štítku). • P330 Vypláchněte ústa. • P332+P313 Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/péči. • P362+P364 Kontaminovaný oděv svlékněte a před dalším použitím vyperte. • P391 Zachycujte rozlité látky. • P405 Skladujte uzamčené. • P501 Zlikvidujte obsah/obal v souladu s vnitrostátními předpisy.	Nebezpečí	Tetrametylchlorid amonný Koncentrace: 49% CAS: 75-57-0
Zesilovač hybridizačního pufru		• H351 Podezření na způsobování rakoviny. • H360 Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.	Nebezpečí	Formamid Koncentrace: 100% CAS: 75-12-7



Název produktu	GHS Piktogram	Prohlášení H&P	Signální slovo	Nebezpečná složka
		- H373 Může způsobit poškození orgánů při dlouhodobé nebo opakované expozici. - P201 Před použitím si obstarejte speciální instrukce. - P202 Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny pokyny pro bezpečné zacházení a neporozuměli jim. - P260 Nevdechujte výpary/aerosoly. - P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje. - P308+P313 V případě expozice nebo obav: Vyhledejte lékařskou pomoc/péči. - P314 Pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. - P405 Skladujte uzamčené. - P501 Zlikvidujte obsah/obal v souladu s vnitrostátními předpisy.		
10x přehřátý promývací pufr		- H302 Zdraví škodlivý při požití. - H315 Dráždí kůži. - H319 Způsobuje vážné podráždění očí	Nebezpečí	Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové Koncentrace: 2.5% CAS: 6381-92-6
10x promývací pufr I		- H228 Hořlavá pevná látka. - H302 Zdraví škodlivý při požití. - H315 Dráždí kůži. - H318 Způsobuje vážné poškození očí. - H332 Zdraví škodlivý při vdechování. - H401 Toxický pro vodní organismy. - H402 Škodlivý pro vodní organismy. - H412 Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. - P273 Zabraňte uvolnění do životního prostředí. - P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje. - P305+P351+P338 Při zasažení očí: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyměňte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.	Nebezpečí	Dodecylsulfát sodný Koncentrace: 4.9% CAS: 151-21-3



Název produktu	GHS Piktogram	Prohlášení H&P	Signální slovo	Nebezpečná složka
		- P310 Okamžitě volejte toxikologické středisko/lékaře. - P501 Zlikvidujte obsah/obal v souladu s vnitrostátními předpisy.		
Pufr DNA ligázy 5x		- H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest. - P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje / ochranu sluchu.	Výstraha	poly(ethylen glykol)ne Koncentrace: 1-5% CAS: 9002-93-1

Jako osobní ochranné prostředky používejte



a



4.1.2 Potřebný materiál (není součástí dodávky)

MATERIÁLY ZAJIŠTĚNÉ UŽIVATELEM (NUTNO ZAKOUPIT ZVLÁŠŤ).

- Sada pro amplifikaci knihovny KAPA™ Library Amplification kit KK2620 (Roche Cat. Č 07958978001)
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami
- Zkumavky 1,5 ml s nízkou vazbou DNA
- Zkumavky 1,5 ml
- Kónické zkumavky 50 ml
- Filtrační hroty
- Ethanol (úroveň jakosti pro molekulární biologii)
- Sekvenační reagentie Illumina®

VYBAVENÍ LABORATOŘE

Způsob předcházení kontaminaci vzorku:

- Zóna před PCR
 - Fluorometrické kvantifikační vybavení a reagentie
 - Magnetický separační stojan (typ 96 jamek)
 - Vícekanálové pipety (P10 nebo P20; P100; P200)
 - Stolní mikro odstředivka (kompatibilní s proužky s 8 zkumavkami)



- Termocykler (programovatelné vyhřívané víko)
- Vortexový mixér
- Zóna po PCR
 - Systém kapilární elektroforézy
 - Vakuový koncentrátor DNA
 - Termoblok nebo vodní lázeň (kompatibilní se zkumavkou 1,5 ml)
 - Fluorometrické kvantifikační vybavení a reagenty
 - Magnetický separační stojan (kompatibilní se zkumavkami 1,5 ml)
 - Magnetický separační stojan (typ 96 jamek)
 - Vícekanálové pipety (P10 nebo P20; P100; P200)
 - Stolní mikro odstředivka (kompatibilní s proužky s 8 zkumavkami)
 - Termocykler (programovatelné vyhřívané víko)
 - Vortexový mixér

4,2 Příprava knihovny

4.2.1. Genomická Příprava DNA

MATERIÁLY

- Dvouvláknová vysoce kvalitní genomová DNA (gDNA)
- Zesilovač FX Enhancer
- IDTE
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami

DŮLEŽITÉ

V tomto kroku je rozhodující integrita, koncentrace a čistota DNA. Čistotu DNA lze posoudit pomocí UV spektrofotometru. Doporučené poměry absorbance jsou v rozmezí 1,8–2,0 pro poměr 260/280 a v rozmezí 1,6 – 2,4 pro poměr 260/230. Doporučujeme potvrdit integritu vzorku kapilární elektroforézou nebo jinou rovnocennou technikou. Aby se předešlo chybám při zadávání DNA, pro získání koncentrace v rozmezí 50 až 100 ng/μl se doporučuje použít výchozí ředění. Koncentraci DNA je třeba potvrdit fluorometrickou kvantifikací (např. Qubit®, Thermo Fisher) a získanou hodnotu použít k výpočtu konečného ředění.

PŘÍPRAVA

Vyjměte zesilovač FX Enhancer ze skladovacího prostoru o teplotě -20 °C a rozmrazte ho při pokojové teplotě. Po rozmrazení promíchejte reagens tak, že zkumavku 5krát jemně převrátíte a krátce odstředíte v mikro odstředivce.



V závislosti na formátu sady se počet vzorků DNA, které se mají sloučit do jedné záchytné reakce, liší podle následující tabulky. To je třeba před zahájením vzít v úvahu.

FORMÁT SADY	Sada 16 vzorků	Sada 32 vzorků	Sada 48 vzorků	Sada 96 vzorků*
Počet jednotlivých knihoven na jeden záchyt	4	8	12	12

* Pro 96 vzorků jsou k dispozici dvě sady po 48 vzorcích, které obsahují 8 záchytných reakcí.

POSTUP

1. Připravte si následující proužky PCR podle počtu reakcí:

POČET REAKCÍ	4	8	12	16	24	32	48
Proužek PCR	4 zkumavky	4 zkumavky	4 zkumavky	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek
Počet proužků	1	2	3	2	3	4	6

2. Připravte ředění pro každý vzorek vysoce kvalitní genomové DNA (gDNA) do příslušného počtu proužků PCR následujícím způsobem:

ŘEDĚNÍ gDNA	
gDNA	200 ng
IDTE	Doplňte do 30 µl

- Krátce promíchejte jemným pipetováním 5krát nahoru a dolů a následně krátkým odstředěním v mikro odstředivce zachyťte veškerou tekutinu.



Tip: Bezpečný bod zastavení přes noc při teplotě 4 °C.

- V závislosti na počtu vzorků postupujte takto:
 - Pokud zpracováváte **4 vzorky**, přidejte 5 µl zesilovače FX do každé zkumavky proužku se 4 zkumavkami obsahujícího 30 µl vzorků gDNA (celkem 35 µl v každé zkumavce proužku se 4 zkumavkami).
 - Pokud zpracováváte **8 nebo více vzorků**, postupujte takto:
 - a. Pro usnadnění pipetování vytvořte zásobník zesilovače FX Enhancer přidáním následujících objemů do nové sady proužků se 4 nebo 8 zkumavkami podle následujícího schématu:



POČET REAKCÍ	8	12	16	24	32	48
Proužek PCR (1 proužek)	4 zkumavky	4 zkumavky	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek
Zesilovač FX Enhancer (v µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- b. Pomocí vícekanálové pipety přidejte 5 µl zesilovače FX Enhancer z výše uvedených zkumavek k 30 µl vzorků gDNA (celkem 35 µl v každé zkumavce proužků se 4 nebo 8 zkumavkami).
 - Pomocí vícekanálové pipety nastavené na 20 µl jemně promíchejte 5krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte v mikro odstředivce.
 3. Uchovávejte na ledu až do nastavení reakce enzymatické fragmentace.

4.2.2 Příprava předsměsí a reagensí

KOMPONENTY A REAGENCIE

- Směs enzymů FX
- Pufr FX 10x
- Pufr DNA ligázy 5x
- DNA ligáza
- Směs HiFi PCR Master Mix 2x
- Startovací směs pro amplifikaci knihovny Illumina®
- Voda bez nukleázy
- Kuličky AMPure® XP
- Ethanol

PŘÍPRAVA

- Vyjměte složky SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I ze skladovacího prostoru o teplotě -20 °C a rozmrazte je na ledu.
- Vyjměte desku s adaptéry s duálním indexem ze skladovacího prostoru o teplotě -20 °C a uložte ji do chladničky o teplotě 4 °C pro pozdější použití.
- Vyjměte kuličky AMPure® XP ze skladovacího prostoru o teplotě 2–8 °C a nechte jejich teplotu nejméně 30 minut vyrovnávat při pokojové teplotě.
- Připravte si čerstvý 80% ethanol (objem podle následujícího schématu v závislosti na počtu reakcí):

80% ETHANOL							
Počet reakcí	4	8	12	16	24	32	48
80% ethanol (v ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Jakmile jsou složky SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I rozmrazeny, promíchejte reagenty převrácením zkumavky 5–10krát a krátce odstředte v mikroadstředivce.



PŘEDSMĚSI

1. Připravte si **reakční předsměs FX** takto:

REAKČNÍ PŘEDSMĚS FX							
Počet reakcí	4	8	12	16	24	32	48
Pufr FX Buffer 10x (v µl)	23,6	47,1	75	95	150	190	300
Směs enzymů FX Enzyme Mix (v µl)	47,1	94,2	150	190	300	380	600

- Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředěte.
- Uchovávejte na ledu.

2. Připravte si **ligační předsměs** takto:

LIGAČNÍ PŘEDSMĚS							
Počet reakcí	4	8	12	16	24	32	48
DNA Ligation Buffer 5x (v µl)	95	190	300	380	600	760	1200
DNA ligáza (v µl)	47,5	95	150	190	300	380	600
Voda bez nukleázy (v µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředěte.
- Uchovávejte na ledu.

Důležité: Pufr pro ligaci DNA je vysoce viskózní, pipetujte opatrně a dbejte na to, abyste získali homogenní ligační předsměs.

3. Připravte si **předsměs PCR** takto:

PŘEDSMĚS PCR							
Počet reakcí	4	8	12	16	24	32	48
Směs HiFi PCR Master Mix 2x (v µl)	115	230	345	460	690	920	1380
Amplifikace knihovny Primer Mix Illumina® Library Amp (v µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Voda bez nukleázy (v µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2



- Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte.
- Uchovávejte na ledu.

4.2.3 Enzymatická fragmentace, koncová oprava End Repair a A-tailing

MATERIÁLY

- Zředěná a kondicionovaná dvouvláknová gDNA v 35 µl
- Reakční předsměs FX
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkuševkami

PŘÍPRAVA

- Naprogramujte termocykler na FX Fragmentation (fragmentaci FX) s následujícími nastaveními:

	TEPLOTA (°C)	ČAS (MINUTY)
Víko	70	-
Krok 1	4	1
Krok 2	32	5
Krok 3	65	30
Podržte	4	∞

- Spusťte program FX Fragmentation (fragmentace FX). Jakmile blok dosáhne kroku 1 (4 °C), pozastavte program.

POSTUP



Důležité: Před inkubací a po ní vždy uchovávejte vzorky a předsměs na ledu, aby se zablokovala enzymatická reakce.

1. V závislosti na počtu vzorků postupujte takto:
 - Pokud zpracováváte **4 vzorky**, přejděte ke kroku 2.
 - Pokud zpracováváte **8 nebo více vzorků**, vytvořte pro usnadnění pipetování zásobník předsměsi FX Reaction přidáním následujících objemů do nové sady proužků se 4 nebo 8 zkuševkami podle následujícího schématu:



POČET REAKCÍ	8	12	16	24	32	48
Proužek PCR (1 proužek)	4 zkumavky	4 zkumavky	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek
Předsměs FX Reaction (v μ l)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Reakci sestavte takto:

- Pokud zpracováváte 8 nebo více vzorků, přidejte pomocí vícekanálové pipety 15 μ l předsměsi FX Reaction ke každému z 35 μ l vzorků gDNA (celkem 50 μ l v proužcích se 4 nebo 8 zkumavkami).
- Pomocí pipety nastavené na 40 μ l (vícekanálové, pokud zpracováváte 8 nebo více vzorků) důkladně promíchejte 5krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte v mikro odstředivce.

3. Vložte do termocykleru a pokračujte v programu FX Fragmentation (fragmentace FX).

Přejděte přímo na oddíl Ligace.

4.2.4 Ligace

MATERIÁLY

- Reakční produkty fragmentace FX po 50 μ l
- Ligační předsměs
- Adaptéry s duálním indexem
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami

PŘÍPRAVA

- Vyjměte desku s adaptéry s duálním indexem z teploty 4 °C (předtím byla přenesena z -20 °C do 4 °C) a krátkým odstředěním desky zachyťte veškerou tekutinu. Formát příslušné desky je uveden v Dodatku 1.
- Během fragmentace FX připravte nové proužky PCR s 5 μ l různých adaptérů s duálním indexem na každou jednotlivou zkumavku podle vaší indexační strategie podle následujícího schématu:

POČET REAKCÍ	4	8	12	16	24	32	48
Proužek PCR	4 zkumavky	4 zkumavky	4 zkumavky	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek
Počet proužků	1	2	3	2	3	4	6

- Nastavte termocykler na 20 °C (otevřené víko).



POSTUP

1. V závislosti na počtu vzorků postupujte takto:

- Pokud zpracováváte **4 vzorky**, přejděte ke kroku 2.
- Pokud zpracováváte **8 nebo více vzorků**, vytvořte pro usnadnění pipetování zásobník s ligační předsměsí v nové sadě proužků PCR podle následujícího schématu:

POČET REAKCÍ	8	12	16	24	32	48
Proužek PCR (1 proužek)	4 zkušavky	4 zkušavky	8 zkušavky	8 zkušavky	8 zkušavky	8 zkušavky
Ligační předsměs (v µl)	100	160	100	160	200	320

2. Pomocí vícekanálové pipety přeneste 50 µl každého reakčního produktu fragmentace FX do proužků se 4 nebo 8 zkušavkami obsahujících 5 µl adaptérů s duálním indexem.
3. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte.
4. Pokud zpracováváte 8 nebo více vzorků, přidejte pomocí vícekanálové pipety 45 µl ligační předsměsi ke každému reakčnímu produktu fragmentace FX (55 µl v každé zkušavce proužku se 4 nebo 8 zkušavkami).
5. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte.
6. Inkubujte v termocykleru při 20 °C po dobu 15 minut (otevřené víko).



Důležité: Na konci ligace neukládejte proužek (proužky) na led, protože by to mohlo snížit navázání DNA na kuličky.

Přejděte na oddíl Čištění po ligaci.

4.2.5 Čištění po ligaci

MATERIÁLY

- Produkty ligační reakce v každých 100 µl
- Kuličky AMPure XP s teplotou vyrovnanou na pokojovou teplotu
- Čerstvě připravený ethanol, 80%
- Voda bez nukleázy
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkušavkami



POSTUP

1. Pomocí vícekanálové pipety přidejte 80 µl kuliček AMPure XP ke každému ze 100 µl produktů ligační reakce. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
3. Umístěte proužky se 4 nebo 8 zkumavkami na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.
4. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte 170 µl supernatantu.

Při následujících krocích ponechte zkumavky na magnetickém stojanu.

5. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 170 µl 80% ethanolu. Inkubujte 30 sekund až 1 minutu.
6. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte ethanol.
7. Ještě jednou zopakujte kroky 5 a 6.
8. Odstraňte zbytkový ethanol pomocí vícekanálové pipety P10 nebo P20.
9. Kuličky sušte na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Kuličky nevysušujte nadměrně, protože by se tím mohlo snížit množství získané DNA.

Vyjměte zkumavky z magnetického stojanu.

10. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 105 µl vody bez nukleázy a počkejte několik sekund.
Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
11. Umístěte proužky se 4 nebo 8 zkumavkami na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.
12. Pomocí vícekanálové pipety opatrně přeneste 100 µl supernatantu do nových označených proužků se 4 nebo 8 zkumavkami.

Přejděte na oddíl Výběr dvojí velikosti.

4.2.6 Výběr dvojí velikosti

MATERIÁLY

- Produkty ligované reakce, vždy ve 100 µl
- Kuličky AMPure XP s teplotou vyrovnanou na pokojovou teplotu
- Čerstvě připravený ethanol, 80%
- IDTE
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami

POSTUP

1. Pomocí vícekanálové pipety přidejte 60 µl kuliček AMPure XP ke každému ze 100 µl produktů ligované reakce. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů.



2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
3. Umístěte proužky se 4 nebo 8 zkumavkami na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.
4. Pomocí vícekanálové pipety opatrně přeneste 140 μ l supernatantu do nových označených proužků se 4 nebo 8 zkumavkami obsahujících 20 μ l kuliček AMPure XP. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů.
5. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
6. Umístěte proužky se 4 nebo 8 zkumavkami na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek na 3 minuty nebo dokud tekutina nezprůhlední.
7. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte 150 μ l supernatantu.

V následujících krocích ponechte zkumavky na magnetickém stojanu.

8. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 170 μ l 80% ethanolu.
Zkumavky nechte stát 30 sekund až 1 minutu.
9. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte ethanol.
10. Ještě jednou zopakujte kroky 8 a 9.
11. Odstraňte zbytkový ethanol pomocí vícekanálové pipety P10 nebo P20.
12. Kuličky sušte na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 4 minut. Kuličky nevysušujte nadměrně, protože by se tím mohlo snížit množství získané DNA.

Vyjměte zkumavky z magnetického stojanu.

13. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 20 μ l IDTE. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředěte.

Přejděte na oddíl Amplifikace knihovny.

4.2.7 Amplifikace knihovny

MATERIÁLY

- Vybrané ligační produkty dvojí velikosti a kuličky resuspendované vždy ve 20 μ l IDTE
- Předsměs PCR

PŘÍPRAVA

Naprogramujte termocykler pro amplifikaci knihovny s následujícími nastaveními:



	TEPLOTA (°C)	ČAS (SEKUNDY)	
Víko	99	-	
Krok 1: Počáteční denaturace	98	120	
Krok 2: Denaturace	98	20	8 cyklů
Krok 3: Chlazení	60	30	
Krok 4: Prodloužení	72	30	
Krok 5: Konečné prodloužení	72	60	
Podržte	10	∞	

POSTUP

1. V závislosti na počtu vzorků postupujte takto:

- Pokud zpracováváte **4 vzorky**, přejděte ke kroku 2.
- Pokud zpracováváte **8 nebo více vzorků**, postupujte takto:
 - a. Pro usnadnění pipetování vytvořte zásobník předsměsi PCR přidáním následujících objemů do nové sady proužků se 4 nebo 8 zkumavkami podle následujícího schématu:

POČET REAKCÍ	8	12	16	24	32	48
Proužek PCR (1 proužek)	4 zkumavky	4 zkumavky	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek	8 zkumavek
Předsměs PCR (v µl)	65	100	65	100	130	200

2. Reakci sestavte takto:

- Pokud zpracováváte 8 nebo více vzorků, přidejte pomocí vícekanálové pipety 30 µl předsměsi PCR k vybraným ligačním produktům dvojí velikosti a kuličkám (celkový objem 50 µl = 30 µl + 20 µl).
- Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte.

3. Vložte zkumavky do termocykleru a spusťte program Amplifikace knihovny.



Tip: Bezpečný bod zastavení přes noc při teplotě 4 °C.



4.2.8 Čištění po amplifikaci

MATERIÁLY

- Reakční produkty PCR, vždy v 50 µl
- Kuličky AMPure XP s teplotou vyrovnanou na pokojovou teplotu
- Čerstvě připravený ethanol, 80%
- Voda bez nukleázy
- Zkumavky s nízkou vazbou DNA pro skladování knihoven

POSTUP

1. Pomocí vícekanálové pipety přidejte 50 µl kuliček AMPure XP ke každým 50 µl produktu PCR. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
3. Umístěte proužky se 4 nebo 8 zkumavkami na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.

4. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte 90 µl supernatantu.

V následujících krocích ponechte zkumavky na magnetickém stojanu.

5. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 170 µl 80% ethanolu.
Zkumavky nechte stát 30 sekund až 1 minutu.
6. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte ethanol.
7. Ještě jednou zopakujte kroky 5 a 6.
8. Odstraňte zbytkový ethanol pomocí vícekanálové pipety P10 nebo P20.
9. Kuličky sušte na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Kuličky nevysušujte nadměrně, protože by se tím mohlo snížit množství získané DNA.

Vyjměte zkumavky z magnetického stojanu.

10. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 20 µl vody bez nukleázy. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
11. Umístěte proužek se 4 nebo 8 zkumavkami na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.
12. Opatrně přeneste 18 µl supernatantu (v tomto kroku se doporučuje přenést dvakrát 9 µl) do nové, označené zkumavky pro uchovávání knihovny.



Tip: Bezpečný bod zastavení přes noc při teplotě 4 °C nebo -20 °C pro delší skladování.



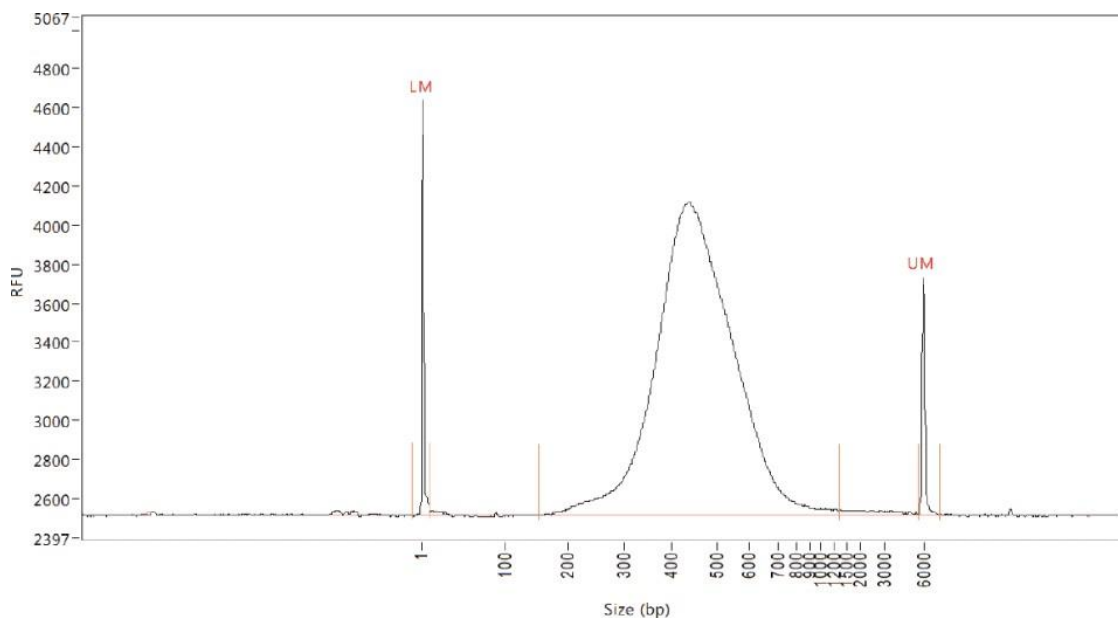
4.2.9 Kvantifikace a kontrola kvality jednotlivých knihoven

MATERIÁLY

- Fluorometrické kvantifikační vybavení a reagentie
- Systém kapilární elektroforézy
- Voda bez nukleázy
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami

POSTUP

1. Připravte čtyřnásobné ředění každé knihovny vodou bez nukleázy (např. 2 µl knihovny v 6 µl vody bez nukleázy).
2. Kvantifikujte knihovny fluorometrickou metodou (např. kvantifikace Qubit HS s použitím 2 µl výše uvedeného ředění knihovny 4x).
3. Kontrola kvality knihoven analýzou jejich profilu pomocí kapilární elektroforézy. Fragmenty knihovny DNA musí mít rozložení velikostí mezi 300 bp a 700 bp.



Příklad rozložení knihovny DNA získané pomocí systému kapilární elektroforézy Agilent Fragment Analyzer.

UM – Horní marker, LM – Dolní marker



4,3 Záchyt

4.3.1 Slučování knihoven

MATERIÁLY

- Jednotlivé knihovny
- Lidská Cot DNA
- Univerzální blokátory – TS Mix
- Zkumavky 1,5 ml s nízkou vazbou DNA

POSTUP

1. Ve zkumavce s nízkou vazbou DNA připravte předsměs následujících látek:

POČET ZÁCHYTŮ (viz tabulku v bodě 3)	1	2	3	4
Lidská Cot DNA (v µl)	5	11	16,5	22
Universal Blockers – TS Mix (in µl)	2	4,4	6,6	8,8

2. Pokud provádíte dva nebo více záchytů, napipetujte 7 µl výše uvedené předsměsi do jednotlivých zkumavek s nízkou vazbou DNA.
3. Do jednotlivých zkumavek obsahujících výše uvedenou předsměs přidejte sloučený obsah jednotlivých knihoven podle formátu sady:

FORMÁT SADY	Sada 16 vzorků	Sada 32 vzorků	Sada 48 vzorků	Sada 96 vzorků
Počet jednotlivých knihoven na jeden záchyt	4	8	12	12
Množství každé knihovny na jeden záchyt	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Celkové množství knihoven na jeden záchyt	1200 ng	1600 ng	1800 ng	1800 ng

4. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte.
5. Každou směs vysušte pomocí vakuového koncentrátoru DNA, dokud není směs zcela lyofilizovaná. K urychlení lyofilizace použijte mírný ohřev (45–50 °C).



Tip: Bezpečný bod zastavení přes noc při teplotě -20 °C.



4.3.2 Hybridizace

MATERIÁLY

- Lyofilizované knihovny
- 2x hybridizační pufr
- Zesilovač hybridizačního pufru
- Hereditary Cancer Solution sondy
- Voda bez nukleázy
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami
- Zkumavky 1,5 ml
- 10x promývací pufr I
- 10x promývací pufr II
- 10x promývací pufr III
- 10x předehřátý promývací pufr
- 2x promývací pufr pro kuličky

PŘÍPRAVA

1. Předehřejte termocykler na 95 °C (víko nastavte na 99 °C).
2. Po desetiminutové denaturaci přepněte přímo na 65 °C (víko nastavte na 75 °C).



Důležité: Doporučujeme použít různé termocyklery pro inkubaci při teplotách 95 °C a 65 °C, jsou-li k dispozici.

POSTUP

1. Připravte si hybridizační předsměs podle počtu záchytných reakcí:

POČET ZÁCHYTŮ	1	2	3	4
2x hybridizační pufr (v µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Zesilovač hybridizačního pufru (v µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Voda bez nukleázy (v µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Resuspendujte lyofilizovanou peletu ve 13 µl hybridizační předsměsi.
3. Resuspendovanou peletu přeneste do zkumavky pro PCR (jedna zkumavka pro jednu záchytnou reakci).
4. Inkubujte v termocykleru při teplotě 95 °C po dobu 10 minut.



Důležité: Nenechte teplotu zkumavky klesnout pod 65 °C od kroku 3 do kroku 5, protože by to mohlo vést k nesprávnému ochlazení sondy.

5. Přesuňte zkumavku s PCR z termocykleru 95 °C do 65 °C a přidejte do směsi 4 µl sond. Pomocí pipety nastavené na 13 µl důkladně promíchejte 5krát pipetováním nahoru a dolů.
6. Inkubujte v termocykleru při teplotě 65 °C po dobu 4 hodin.
7. Předem si připravte pracovní roztoky 1x různých promývacích pufrů podle popisu na následujících stránkách, aby se jim během hybridizační reakce umožnilo dosáhnout rovnováhy.



PŘÍPRAVA PROMÝVACÍHO PUFRU PRO 1 REAKCI

PUFR	VYROVNÁVACÍ PUFŘ (μl)	VODA (μl)	KONEČNÝ OBJEM 1X (μl)
10x promývací pufr I	33	297	330
10x promývací pufr II	22	198	220
10x promývací pufr III	22	198	220
10x předehřátý promývací pufr	44	396	440
2x pufr pro promývání kuliček	275	275	550



Důležité: Předehřívajte 1x předehřívací pufr a alikvotní část 110 μl 1x promývacího pufru I při 65 °C v termobloku nebo vodní lázni po dobu nejméně 2 hodin. Zbývající promývací pufr I uchovávejte při pokojové teplotě.

PŘÍPRAVA PROMÝVACÍHO PUFRU PRO 2 REAKCE

PUFR	VYROVNÁVACÍ PUFŘ (μl)	VODA (μl)	KONEČNÝ OBJEM 1X (μl)
10x promývací pufr I	66	594	660
10x promývací pufr II	44	396	440
10x promývací pufr III	44	396	440
10x předehřátý promývací pufr	88	792	880
2x pufr pro promývání kuliček	550	550	1100



Důležité: Předehřívajte 1x předehřívací pufr a alikvotní část 220 μl 1x promývacího pufru I při 65 °C v termobloku nebo vodní lázni po dobu nejméně 2 hodin. Zbývající promývací pufr I uchovávejte při pokojové teplotě.

PŘÍPRAVA PROMÝVACÍHO PUFRU PRO 3 REAKCE

PUFR	VYROVNÁVACÍ PUFŘ (μl)	VODA (μl)	KONEČNÝ OBJEM 1X (μl)
10x promývací pufr I	99	891	990
10x promývací pufr II	66	594	660
10x promývací pufr III	66	594	660
10x předehřátý promývací pufr	132	1188	1320
2x pufr pro promývání kuliček	825	825	1650



Důležité: Předehřívajte 1x předehřívací pufr a alikvotní část 330 μl 1x promývacího pufru I při 65 °C v termobloku nebo vodní lázni po dobu nejméně 2 hodin. Zbývající promývací pufr I uchovávejte při pokojové teplotě.



PŘÍPRAVA PROMÝVACÍHO PUFRU PRO 4 REAKCE

PUFR	VYROVNÁVACÍ PUFŘ (μl)	VODA (μl)	KONEČNÝ OBJEM 1X (μl)
10x promývací pufr I	132	1188	1320
10x promývací pufr II	88	792	880
10x promývací pufr III	88	792	880
10x předeřřatý promývací pufr	176	1584	1760
2x pufr pro promývání kuliček	1100	1100	2200



Důležité: Předeřřávejte 1x předeřřávaný pufr a alikvotní část 440 μl 1x promývacího pufru I při 65 °C v termobloku nebo vodní lázni po dobu nejméně 2 hodin. Zbývajcí promývací pufr I uchovávejte při pokojové teplotě.

4.3.3 Příprava streptavidinových kuliček

MATERIÁLY

- Streptavidinové kuličky s teplotou vyrovnanou na pokojovou teplotu
- 1x pufr pro promývání kuliček
- Zkumavky 1,5 ml
- Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami

POSTUP

Tyto kroky proveďte těsně před koncem čtyřhodinové hybridizační inkubace.

1. Míchejte kuličky vortexováním po dobu 15 sekund.
2. Přeneste 100 μl kuliček na jeden záchyt (200 μl pro 2 reakce, 300 μl pro 3 reakce, 400 μl pro 4 reakce) do jedné zkumavky 1,5 ml.
3. Umístěte zkumavku na magnetický stojan a nechte ji stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
4. Do zkumavky přidejte 200 μl 1x pufru pro promývání kuliček na jeden záchyt (400 μl pro 2 reakce, 600 μl pro 3 reakce, 800 μl pro 4 reakce). Vortexujte po dobu 10 sekund.
5. Umístěte zkumavku na magnetický stojan a nechte ji stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
6. Ještě jednou zopakujte kroky 4 a 5.
7. Do zkumavky přidejte 100 μl 1x pufru pro promývání kuliček na jeden záchyt (200 μl pro 2 reakce, 300 μl pro 3 reakce, 400 μl pro 4 reakce). Vortexujte po dobu 10 sekund.



8. Přeneste 100 µl vyčištěných kuliček do nové zkumavky pro PCR (jedna zkumavka pro jednu záchytnou reakci).
9. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan s formátem desky 96 jamek a nechte ji (je) stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.



Důležité: Nenechte kuličky zaschnout.

Přejděte přímo na oddíl Navázání hybridizovaných cílů na kuličky.

4.3.4 Navázání hybridizovaných cílů na kuličky

MATERIÁLY

- Vyčištěné streptavidinové kuličky ve zkumavce (zkumavkách) PCR
- Hybridizační reakce

POSTUP

Důležité: Pracujte rychle, aby teplota vzorku zůstala blízko 65 °C.

1. Vyjměte hybridizační reakci (reakce) z termocykleru, zkumavku (zkumavky) krátce odstředte a vložte je zpět do termocykleru.
2. Umístěte promyté zkumavky se streptavidinovými kuličkami do termocykleru (nejvýše dvě zkumavky najednou, aby nedošlo k vysušení kuliček).
3. U každé hybridizační reakce přeneste 17 µl roztoku pro hybridizační reakci do jedné zkumavky PCR obsahující vyčištěné kuličky. Resuspendujte kuličky pipetováním nahoru a dolů, dokud roztok nebude homogenní.
4. Provedte navázání DNA na kuličky vložním zkumavky (zkumavek) do termocykleru nastaveného na 65 °C (víko na 75 °C). Inkubujte po dobu 45 minut.
5. Během inkubace každých 15 minut jemně pipetujte zkumavku (zkumavky) nahoru a dolů, aby kuličky zůstaly v suspenzi.

Přejděte přímo na oddíl Promývání streptavidinových kuliček pro odstranění nenavázané DNA.

4.3.5 Promývání streptavidinových kuliček pro odstranění nenavázané DNA

MATERIÁLY

- | | |
|--|--|
| • Hybridizované cíle na kuličkách | • 1x promývací pufr II |
| • Proužky bez RNázy/DNázy 0,2 ml s 8 zkumavkami | • 1x promývací pufr III |
| • Zkumavky 1,5 ml s nízkou vazbou DNA | • 1x předehřátý promývací pufr (při 65 °C) |
| • 1x promývací pufr I (1/3 při 65 °C a 2/3 při pokojové teplotě) | • Voda bez nukleázy |
| | • IDTE |



POSTUP



Důležité: Zajistěte, aby teplota zůstala v krocích 1 až 7 blízko 65 °C.

Poznámka: Pokud pracujete se dvěma nebo více záchytnými zkumavkami, postupujte střídavým způsobem od kroku 2 do kroku 8, včetně následujících kroků:

1. Po vložení první zkumavky do termobloku při teplotě 65 °C pro 1. inkubaci trvající 5 minut (krok 5) spusťte časovač.
2. Začněte zpracovávat druhou zkumavku.
3. Při umístění druhé zkumavky do 65 °C si zaznamenejte čas, který odděluje zkumavky, a dbejte na to, abyste tento časový odstup v krocích 2 až 8 dodržovali, aby se zajistilo inkubování každé zkumavky přesně 5 minut při 65 °C s předeřtým promýváním.

1. Do každé zkumavky s hybridizovaným cílem / streptavidinovými kuličkami přidejte 100 µl 1x promývacího pufru I (při 65 °C).
2. Zpracovávejte jednu zkumavku po druhé, suspendujte je a přeneste postupně jednu po druhé do nové 1,5ml zkumavky s nízkou vazbou DNA. Pokud pracujete se dvěma nebo více záchytnými zkumavkami, postupujte střídavým způsobem, jak je uvedeno výše.
3. Umístěte zkumavku na magnetický stojan a nechte ji stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
4. Do zkumavky přidejte 200 µl 1x předeřtého promývacího pufru (při teplotě 65 °C).

Jemně resuspendujte kuličky pipetováním nahoru a dolů.

Silné promíchání kuliček s předeřtým promývacím pufrem by mohlo snížit kvalitu zachytu.

5. Inkubujte při 65 °C po dobu 5 minut.
6. Umístěte zkumavku na magnetický stojan a nechte ji stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
7. Ještě jednou zopakujte kroky 4 až 6.

Pracujte při pokojové teplotě.

8. Do zkumavky přidejte 200 µl 1x promývacího pufru I (při pokojové teplotě). Jemně resuspendujte kuličky pipetováním nahoru a dolů.

Poznámka: Pokud pracujete se 2 nebo více zkumavkami, od tohoto kroku zpracovávejte všechny zkumavky současně.

9. Vortexujte po dobu 2 minut.
10. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan a nechte ji (je) stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.



11. Do každé zkumavky přidejte 200 µl 1x promývacího pufru II. Vortexujte po dobu 1 minuty.
12. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan a nechte ji (je) stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
13. Do každé zkumavky přidejte 200 µl 1x promývacího pufru III. Vortexujte po dobu 30 sekund. Krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
14. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan a nechte ji (je) stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
15. Do každé zkumavky přidejte 200 µl 1x IDTE. Kuličky resuspendujte. Krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
16. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan a nechte ji (je) stát, dokud roztok nezprůhlední. Supernatant opatrně odeberte a zlikvidujte.
17. Pomocí pipety P10 nebo P20 odstraňte veškerou zbývající kapalinu.
18. Do každé zkumavky přidejte 20 µl vody bez nukleázy, resuspendujte a přeneste směs kuliček/vody do nové zkumavky pro PCR.

4.3.6 Amplifikace po záchytu

MATERIÁLY

- Suspenze streptavidinových kuliček ve vodě bez nukleázy (20 µl)
- 2x hotová směs pro start za tepla KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x startovací směs pro amplifikaci knihovny
- Voda bez nukleázy

PŘÍPRAVA

Naprogramujte termocykler na amplifikaci po záchytu s využitím pomocí následujících nastavení:

	TEPLOTA (°C)	ČAS (SEKUNDY)	
Víko	99	-	14 cyklů
Krok 1: Počáteční denaturace	98	45	
Krok 2: Denaturace	98	15	
Krok 3: Chlazení	60	30	
Krok 4: Prodloužení	72	30	
Krok 5: Konečné prodloužení	72	60	
Podržte	10	∞	



POSTUP

1. Připravte si předsměs PCR takto:

PŘEDSMĚS PCR				
Počet reakcí	1	2	3	4
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (v µl)	25	55	82,5	110
10x startovací směs pro amplifikaci knihovny (v µl)	2,5	5,5	8,25	11
Voda bez nukleázy (v µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Ke každé suspenzi kuliček přidejte 30 µl předsměsi PCR. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů a krátce odstředte.
3. Umístěte zkumavky do termocykleru a spusťte program Post-Capture Amplification (amplifikace po záchytu).



Tip: Bezpečný bod zastavení přes noc při teplotě 4 °C nebo -20 °C pro delší skladování.

4.3.7 Čištění amplifikace po záchytu

MATERIÁLY

- Reakční produkty PCR, vždy v 50 µl
- Kuličky AMPure® XP s teplotou vyrovnanou na pokojovou teplotu
- Čerstvě připravený ethanol, 80%
- IDTE
- Zkumavky s nízkou vazbou DNA pro skladování knihoven

POSTUP

1. Ke každému z 50 µl reakčních produktů PCR přidejte 50 µl kuliček AMPure® XP. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
3. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.
4. Pomocí vícekanálové pipety opatrně odstraňte 90 µl supernatantu.

V následujících krocích ponechte zkumavku (zkumavky) na magnetickém stojanu.

5. Pomocí vícekanálové pipety přidejte ke kuličkám 170 µl 80% ethanolu. Zkumavky nechte stát 30 sekund až 1 minutu.
6. Opatrně odstraňte ethanol.



7. Ještě jednou zopakujte kroky 5 a 6.
8. Odstraňte zbytkový ethanol pomocí pipety P10 nebo P20.
9. Kuličky sušte na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Kuličky nevysušujte nadměrně, protože by se tím mohlo snížit množství získané DNA.

Vyjměte zkumavku (zkumavky) z magnetického stojanu.

10. Ke kuličkám přidejte 20 μ l IDTE. Důkladně promíchejte 10krát pipetováním nahoru a dolů. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut a krátkým odstředěním zachyťte veškerou tekutinu.
11. Umístěte zkumavku (zkumavky) na magnetický stojan na 5 minut nebo dokud tekutina nezprůhlední.
12. Opatrně přeneste 18 μ l supernatantu (v tomto kroku se doporučuje přenést dvakrát 9 μ l) do nové, označené zkumavky pro uchovávání knihovny.



Tip: Bezpečný bod zastavení přes noc při teplotě 4 °C nebo -20 °C pro delší skladování.

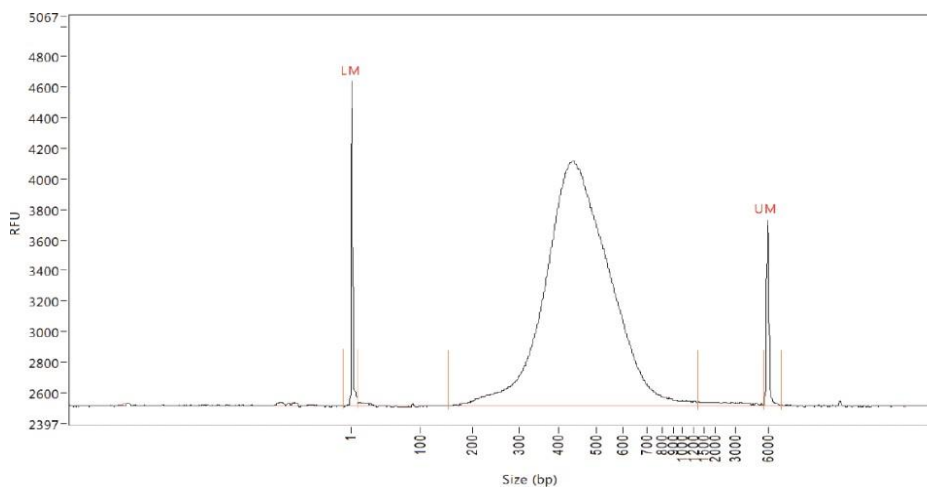
4.3.8 Konečná kvantifikace a kontrola kvality knihovny

MATERIÁLY

- Fluorometrické kvantifikační vybavení a reagentie
- Systém kapilární elektroforézy

POSTUP

1. Kvantifikujte každý zachycený sloučený obsah knihoven pomocí fluorometrické metody (např. kvantifikace Qubit HS s použitím 2 μ l knihovny).
2. Kontrola kvality zachyceného sloučeného obsahu knihoven analýzou jejich profilu pomocí kapilární elektroforézy. Fragmenty knihovny DNA musí mít rozložení velikostí mezi 300 bp a 700 bp.



Příklad rozdělení velikosti zachyceného sloučeného obsahu knihoven získaného pomocí systému kapilární elektroforézy Agilent Fragment Analyzer. UM – Horní marker, LM – Dolní marker



4.4. Sekvenování

4.4.1 Příprava knihovny pro sekvenování

MATERIÁLY

- Sada reagensí Illumina MiSeq® Reagent Kit v3
- Konečné zachycené knihovny
- Pufr EBT nebo podobný

POSTUP

1. Určete molaritu každého zachyceného sloučeného obsahu knihoven s průměrnou velikostí knihovny (velikost píku v párech bází) a koncentrací (ng/μl) získanou v kroku 5.3.8 takto:

$$\text{Molarita knihovny (nM)} = \frac{\text{Koncentrace knihovny (ng/μl)}}{\text{Průměrná velikost v párech bází} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Zředte každý sloučený obsah na 4 nM a smíchejte je ve stejném množství (např. 5 μl od každého). Dobře promíchejte a použijte
toto ředění podle standardního doporučení pro denaturaci platného pro Illumina®.
3. Vložte denaturované knihovny v ředění 10 pM do přístroje MiSeq®.
4. Doporučené minimum čtení je 1.0 milionů čtení na vzorek, se čtenou délkou 300 bp.

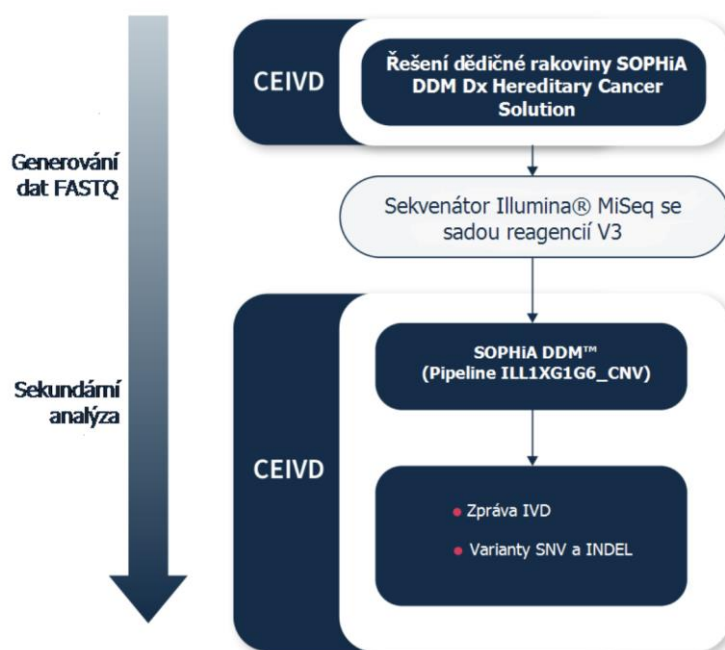


5. POSTUP ANALÝZY

5.1 SOPHiA DDM™ Dx Mode Pokyny k instalaci

Pro použití režimu SOPHiA DDM™ Dx není nutná žádná instalace. E-mailem obdržíte pokyny a odkaz na režim SOPHiA DDM™ Dx. Informace o správě účtu, kompatibilitě prohlížečů a další důležitá upozornění najdete v uživatelské příručce SOPHiA DDM™ Dx. Podpůrné dokumenty jsou také k dispozici přímo prostřednictvím režimu SOPHiA DDM™ Dx.

5.2 Popis pracovního postupu analýzy pro generování výsledků IVD



Popis pracovního postupu analýzy pro SOPHiA DDM™ Dx Hereditary Cancer Solution

Úplný popis postupu nahrávání naleznete v uživatelské příručce k režimu SOPHiA DDM™ Dx.



6. OMEZENÍ, VÝSTRAHY A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

OBECNÉ VÝSTRAHY

- Podrobné pokyny k softwaru naleznete v uživatelské příručce k režimu SOPHiA DDM™ Dx.
- Pokud se změní jakákoli část manipulace, protokolu, sekvenátoru, multiplexování atd., popsany návod k použití pro dané analýzy neplatí.
- Údaje uvedené ve zprávě o kvalitě (k dispozici ke stažení z platformy režimu SOPHiA DDM™ Dx) mají pouze informativní charakter a nejsou určeny k diagnostice.
- Přesnost výsledků analýzy nelze zaručit. Sekvenační laboratoře musí provádět kontroly kvality vzorků a označovat nekvalifikované vzorky. Nekvalifikované vzorky (např. nedostatečný vzorek biopsie) by mohly vést ke zkresleným výsledkům. Společnost SOPHiA GENETICS nenes odpovědnost za výsledky a následná rozhodnutí přijatá na základě těchto výsledků.
- K dosažení správné funkční způsobilosti výrobku je kromě přísného dodržování návodu k obsluze nutné dodržovat standardy a postupy správné laboratorní praxe. Konkrétní bezpečnostní informace naleznete v příslušných materiálových bezpečnostních listech (MSDS) dodávaných s každou komponentou výrobku.
- Je třeba vymezit fyzicky oddělené místnosti před a za místností odběru PCR, aby se zabránilo kontaminaci vzorků DNA. Vždy používejte čerstvá činidla, správně extrahovanou a skladovanou DNA. Podrobnosti o kvalitě a integritě DNA naleznete v oddílu 5 návodu k obsluze. Materiály a metody sady – Oddíl 5.2.1 Příprava genomové DNA.
- K provedení experimentu je třeba používat správně kalibrované pipety a vhodné laboratorní vybavení.
- Je třeba se vyvarovat společného použití různých čísel šarží činidel.
- Rozhodnutí o péči a léčbě pacienta musí vycházet z nezávislého lékařského úsudku ošetřujícího lékaře, který vezme v úvahu všechny příslušné informace o stavu pacienta, jako je anamnéza pacienta a jeho rodiny, fyzikální vyšetření, informace z dalších diagnostických testů a pacientovy preference, v souladu se standardy péče v dané komunitě.

OBECNÁ OMEZENÍ

- Špatná kvalita dat v důsledku problémů při přípravě vzorku nebo v kroku sekvenování může rušit analýzu dat a způsobit falešně pozitivní (False Positives) a/nebo falešně negativní výsledky (False Negatives).
- Nepřítomnost varianty ve zprávě nevylučuje přítomnost varianty pod mezní hodnotou detekce analýzy.
- Přeslechy vzorků způsobené nesprávným přiřazením indexům mohou vést k falešně pozitivním hlášením variant. Ve většině případů budou tyto varianty detekovány s nízkou frakcí (0,1–2 %) a proto budou filtrovány jako varianty s nízkou spolehlivostí. Následující faktory mohou zhoršit vzájemné ovlivňování vzorků v důsledku nesprávného přiřazování indexům a vést k vyšším variantním frakcím:
 - Velmi vysoké pokrytí u jednoho nebo několika málo vzorků v důsledku problémů při kvantifikaci/normalizaci vzorků nebo vysokoúrovňových genových amplifikací.



VARIANTY SNV / INDEL

- Detekce variant v tomto produktu byla optimalizována pro detekci variant SNV a krátkých INDEL (do 2/3 čtené délky). Vezměte prosím na vědomí, že jakýkoli jiný typ alterace může algoritmus přehlédnout.
 1. Fúze nebo inverze genů nelze detekovat.
 2. Delece nebo inserce s bodem zlomu mimo cílovou oblast nemusí být detekovány.
 3. Rozsáhlé delece delší než přibližně 5 000 bp nemusí být správně zmapovány a mohou být přehlédnuty.
 4. Rozsáhlé inserce, které jsou delší než přibližně 2/3 čtené délky, mohou být přehlédnuty z důvodu nedostatečné délky kotvy pro identifikaci místa inserce.
 5. Duplikace, které nejsou plně pokryty kompletními čteními (včetně referenční sekvence, která je duplikována), mohou být přehlédnuty.
 6. V případě tandemové duplikace o délce větší než 1/3 čtené délky nelze určit přesný počet tandemových opakování.
 7. Inserce Alu delší než 2/3 čtené délky mohou být detekovány, pokud odpovídají alespoň jedné sekvenci v databázi známých Alu sekvencí. V opačném případě budou přehlédnuty.
 8. Kvantifikace inzercí delších než čtená délka může zvýšit riziko nadhodnocení podílů variant.
- Detekce variant v tomto produktu byla optimalizována na oblastech definovaných jako „cílové oblasti“. Upozorňujeme, že výsledkem umístění oblastí mimo tuto definici mohou být falešně negativní (False Negatives) a/nebo falešně pozitivní výsledky (False Positives).
- Pro stabilní funkční způsobilost analýzy dat doporučujeme pokrytí alespoň 200x. Pro spolehlivé hlášení variant se doporučuje minimální pokrytí 50x. Varianty mohou být přehlédnuty v oblastech, které vykazují nižší pokrytí.
- Může dojít k přehlédnutí variant nebo jejich nesprávnému hlášení z důvodu omezení v návrhu sady.
- Varianty v oblastech, pro které sondy příslušný fragment DNA nezachycují, nelze produktem detekovat. Zachycení variant může být omezeno těmito faktory:
 1. Varianty INDEL, které ovlivňují hybridizaci sond. To může vést k tomu, že nebude detekována žádná varianta nebo že dojde k nesprávnému odhadu jejího podílu.
 2. Přítomnost dalších mutací v cílové oblasti sondy na stejné alele.
- Varianty SNV nebo INDEL v homopolymerech o délce deset nebo více nelze spolehlivě ohlásit, protože jejich detekce je rušena vysokým šumem pozadí.
- Komplexní aberace DELIN mohou být hlášeny jako vícenásobné varianty v případě, že jsou v zarovnání zastoupeny jako větší počet menších variant, které od sebe oddělují více než 2 nukleotidy.
- Problematické oblasti v Dodatku 4 jsou určité intronické oblasti v rámci cíle, které by mohly způsobit určitou nejistotu při hlášení variant. Mohlo by to souviset s technologií sekvenování. Varianta detekovaná v této oblasti bude v tabulce spolehlivosti v SOPHiA DDM™ označena jako „nízká“.
- Oblasti označené v Dodatku 4 vykazují vlastnosti, které znemožňují spolehlivou detekci variant. Tyto oblasti jsou v rozhraní SOPHiA DDM™ ohlášeny s výstrahami a varianty detekované v těchto oblastech jsou označeny příznakem.



- Oblasti s vysokou sekvenční homologií mohou způsobit nejistotu mapování a riziko nezachycení nebo hlášení nesprávných variant.
- Varianty mohou být v dané oblasti zastoupeny v různých formách. Pokud je varianta v zarovnaných čteních zastoupena dvěma různými způsoby nebo je v některých čteních částečně nezarovnaná, může být podíl variant podhodnocený nebo může být varianta přehlédnuta z důvodu nízkého podílu variant.
- V případě výskytu více inzercí/duplikací ve stejné oblasti nemusí být všechny z nich správně ohlášeny. Zejména v případech, kdy je menší inzerce celá obsažena ve větší inzerci, nemusí existovat žádné čtení, které by jednoznačně identifikovalo menší inzerci, ta může být přehlédnuta a může být ohlášena pouze větší inzerce.
- V případě více výskytů inzerce/duplikace ve stejné oblasti nemusí být všechny správně kvantifikovány. Zejména v případech, kdy je menší inzerce celá obsažena ve větší inzerci, nemusí existovat žádné čtení, které by jednoznačně identifikovalo menší inzerci. Podíl varianty hlášený pro menší inzerci pak může být podhodnocený a podíl varianty větší inzerce nadhodnocený.
- Přítomnost mozaikové genetiky u pacienta by mohla vést k nepřesné interpretaci výsledků.



7. NEKLINICKÉ HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI

7.1 VLASTNOSTI ANALYTICKÉ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI

Následující studie je rozdělena do dvou částí. První část popisuje studii hodnocení funkční způsobilosti provedenou pro SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 a sadu pro amplifikaci knihovny KAPA™. Druhá část obsahuje studii bez regrese mezi SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0 a v1.1 s použitím amplifikační sady KAPA™ Library Amplification Kit nebo sady SOPHiA GENETICS DNA Library Prep I Kit. Tato poslední část obsahuje informace o genu APC obsažené v SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1.

7.2 METODY

Obecné

V této studii byla hodnocena funkční způsobilost sady SOPHiA DDM™ Dx HCS a SOPHiA DDM™ Dx pipeline ILL1XG1G6_CNV na základě dat generovaných na přístroji Illumina MiSeq® pomocí testu SOPHiA DDM™ Dx HCS. Byly použity výchozí filtry týkající se nízkého pokrytí (mezní hodnota 50X), podílu variant (mezní hodnota pro SNV 20 %, mezní hodnota pro INDEL 15 %) a délky homopolymerní oblasti (mezní hodnota 10 bp). U každého vzorku byly varianty detekované prostřednictvím pipeline porovnány se „zlatým standardem“ potvrzených variant poskytnutých jednotlivými sekvenačními centry. Žádné varianty detekované mimo cílové oblasti nebyly brány v úvahu.

Vzhledem k tomu, že panel SOPHiA DDM™ Dx HCS se týká detekce zárodečných variant, nebylo nutné provádět hodnocení meze detekce (LOD), protože očekávané podíly variant jsou výrazně vyšší než možné úrovně sekvenačního šumu.

Definice citlivosti, specifity, přesnosti, preciznosti, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti

Každá pozice, která byla analyzována jak referenční metodou, tak metodou kombinující použití přístroje MiSeq® a panelu SOPHiA DDM™ Dx HCS, byla zohledněna při výpočtu parametrů analytické funkční způsobilosti, jako je citlivost, specifita, přesnost, preciznost a konzistentnost.

Pro všechny pozice pokryté panelem SOPHiA DDM™ Dx HCS, pro které byly k dispozici referenční informace, byly určeny počty následujících kategorií: Skutečně pozitivní (True Positives (TP)) a skutečně negativní (True Negatives (TN)) jsou přítomny v obou sadách, falešně pozitivní (False Positives (FP)) jsou přítomny pouze u variant detekovaných pomocí SOPHiA DDM™ Dx a falešně negativní (False Negatives (FN)) jsou přítomny pouze v tabulce potvrzených variant. Všechny snímané pozice (TP+FP+TN+FN) byly určeny odečtením neurčených pozic od cílové oblasti panelu:

Cílová oblast panelu SOPHiA DDM™ Dx HCS: CDS ± 25bp (úplný seznam cílových oblastí a příslušných problematických a označených oblastí je uveden v Dodatku 4).

Nedefinované oblasti: Oblasti s pokrytím <50x

Identifikované problematické oblasti nebo oblasti s pseudogeny, jak je uvedeno v naší dokumentaci k pipeline SOPHiA DDM™ Dx HCS (Dodatek 4).

Kromě toho byly z výpočtů vyloučeny varianty INDEL nacházející se v homopolymerních oblastech o délce větší než 9 bp.



Všechny parametry byly vypočteny podle následujících vzorců:

1. **Citlivost** byla stanovena jako procentuální podíl potvrzených detekovaných variant:

$$\text{Citlivost} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. **Specifičnost** byla stanovena jako procentuální podíl negativních pozic, které byly správně identifikovány jako negativní:

$$\text{Specifičnost} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(přičemž TN= všechny snímané pozice-TP-FP-FN)

3. **Přesnost** byla stanovena jako procentuální podíl správných hlášení (pozitivních i negativních):

$$\text{Přesnost} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. **Preciznost** byla stanovena jako procentuální podíl správných pozitivních hlášení ze všech pozitivních hlášení:

$$\text{Preciznost} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. **Opakovatelnost sekvenování** byla stanovena pro každý pár replikací A a B v rámci série jako procentuální podíl dobře definovaných bází (SP) v obou vzorcích mezi bázemi, které byly dobře definovány alespoň v jednom vzorku. Báze jsou považovány za dobře definované, pokud jsou dostatečně pokryté a neobsahují hlášení variant s nízkou spolehlivostí.

$$\text{Opakovatelnost sekvenování} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}{\sum_{i \in [SP_A \cup SP_B]} 1}$$

6. **Opakovatelnost varianty** – pro výpočet podílu bází, které jsou v obou replikacích shodné, se berou v úvahu všechny pozice, které byly v obou replikátech dobře definovány. Vzhledem k replikacím A a B v rámci série s přesně definovanými pozicemi SP_A a SP_B jsou SP_A[i] a SP_B[i] stavy varianty na pozici i. Jestliže dx je operátor vracející 1, když x=0, a 0, když x≠0, opakovatelnost varianty je definována jako:

$$\text{Opakovatelnost varianty} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} dx[SP_A[i] - SP_B[i]]}{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}$$

7. **Opakovatelnost** byla definována jako součin dvou výše uvedených hodnot:

$$\text{Opakovatelnost} = \text{Opakovatelnost varianty} \times \text{Opakovatelnost sekvenování} \times 100$$

8. **Reprodukovatelnost** byla definována ekvivalentně k opakovatelnosti (viz vzorce (5)–(7)) pro replikace A a B mezi sériemi.

TP, FP, TN a FN byly vypočteny součtem všech vzorků z každé série. Při výpočtu citlivosti, specifičnosti, přesnosti a preciznosti byly s využitím výše uvedených vzorců použity tyto celkové vypočtené hodnoty. Specifičnost, přesnost a preciznost byly vypočteny pouze na základě plně charakterizovaných vzorků, protože v částečně charakterizovaných



vzorcích chyběly pravdivě negativní (True Negative) pozice. Opakovatelnost a reprodukovatelnost byly vypočteny s použitím všech poloh pro všechny vzorky a všechny uvažované série.

Pro stanovení intervalů spolehlivosti v případě 100% citlivosti nebo jiných hodnot byly použity metody popsané Mattocksem et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). V případech, kdy bylo naměřené kritérium menší než 100 %, byla pro získání intervalu spolehlivosti binomická pravděpodobnost pro citlivost, specifickou, přesnost a preciznost (Clopper C a kol., Biometrika, 1934) použita exaktní metoda (Clopper a kol. 1934). Aby se vzala v úvahu skutečná diverzita variant, byly při výpočtu intervalu spolehlivosti použity pouze jedinečné TP, FP, FN a TN.

7.3 DATA (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Dostupné vzorky byly rozděleny do dvou kategorií v závislosti na charakterizaci vysoké spolehlivosti, která je k dispozici pro srovnávací kritéria. Nejprve byly částečně charakterizované vzorky, u nichž byly identifikovány známé varianty s vysokou spolehlivostí, zpracovány buď společností SOPHiA GENETICS (místo A), nebo externími partnery (místa B až G). Tyto výsledky obsahují velké množství reprezentativních klinických případů a umožňují odhadnout citlivost pro hlášení variant. Kromě toho byly zahrnuty replikace pro odhad opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

Druhou kategorií vzorků tvoří referenční a klinické vzorky, u nichž byly rozsáhlé části cílových oblastí SOPHiA DDM™ Dx HCS analyzovány buď pomocí diagnostické pipeline s označením CE-IVD, SOPHiA DDM™ Dx—BRCA—MASTR Dx—GL—MiSeq, nebo alespoň dvěma samostatnými experimenty NGS, u nichž se zohledňují pouze konsenzuální pozice.

7.4 OBECNÉ ZÁVĚRY (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Následující tabulka obsahuje kompletní přehledy detekovaných variant v porovnání se seznamem potvrzených variant (TP/FN) pro každou sérii obsahující částečně charakterizované vzorky.

Tabulka 2. Souhrny variant pro každou sérii částečně charakterizovaných vzorků

Série	Počet vzorků	TP	FN
SiteA_01	22	343	0
SiteA_02	10	11	0
SiteA_03	11	124	0
SiteA_04	5	5	0
SiteB_01	12	27	0
SiteB_02	8	9	0
SiteC_01	12	115	0
SiteC_02	12	72	0
SiteD	13	28	0
SiteE	9	57	0
SiteF	18	286	0
SiteG	27	180	0
Celkem	159	1257	0



Následující tabulka 3 obsahuje kompletní přehledy detekovaných variant v porovnání se seznamem potvrzených variant (TP/FN/FP) a pozic bází bez variant (TN) pro každou sérii plně charakterizovaných vzorků.

Tabulka 3. Souhrny variant pro každou sérii plně charakterizovaných vzorků

Série	Počet vzorků	TP	FN	FP	TN
Série A	24	665	0	0	1515530
Série B	24	329	0	2	583462
Série C	11	439	0	0	980668
Celkem	59	1433	0	2	3079660

V následující tabulce jsou uvedeny jedinečné pozice báze TN a její varianty detekované v této studii hodnocení funkční způsobilosti. Celkový počet pozic bází v analyzovaných oblastech byl 90754 bází. Ve studii bylo detekováno tři sta sedmdesát tři (373) jedinečných variant. Skutečně negativní výsledky (True negatives) byly sloučeny ve všech vzorcích, u nichž byla k dispozici referenční data s vysokou spolehlivostí, a zahrnovaly celkem 90623 pozic.

Tabulka 4. Souhrny variant ve všech sériích

TP	373
FP	2
FN	0
TN	90623

7.5 VÝSLEDKY (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0)

Kombinace přístroje Illumina MiSeq®, testu SOPHiA DDM™ Dx HCS a SOPHiA DDM™ vedla k výsledované funkční způsobilosti 100% citlivosti, 99,99% specifčnosti, 99,99% přesnosti, 99,86% preciznosti, 99,983% opakovatelnosti a 99,93% reprodukovatelnosti.

Tabulka 5. Shrnutí funkční způsobilosti

Č.	Měření funkční způsobilosti	Průměr	5. percentil
A	Míra zacílení	79,39%	[59,23%]
B	Rovnoměrnost	99,72%	[98,24%]



Č.	Měření funkční způsobilosti	Pozorováno	[spodních 95 % CI]*
1	Citlivost	100%	[99,20%]
2	Specifičnost	99,99%	[99,99%]
3	Přesnost	99,99%	[99,99%]
4	Preciznost	99,86%	[96,42%]
5	Opakovatelnost	99,98%	[99,98%]
6	Reprodukovatelnost	99,93%	[99,92%]

* Pro jedinečné varianty byly ve studii hodnocení funkční způsobilosti vypočteny 95% CI, aby odrážely skutečnou rozmanitost variant.

** 95% CI byly vypočteny pro všechny pozice u všech vzorků. Opakovatelnost a reprodukovatelnost vycházejí z replik.

7.6 DOPLŇOVACÍ STUDIE (SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1)

SOPHiA GENETICS HCS v1.0 byla již dříve důkladně testována na velkém rozsahu potvrzených variant a s použitím dobře charakterizovaných vzorků. Zpracováním stejných vzorků pomocí různých sad (SOPHiA GENETICS HCS v1.0 and SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1) a reagensů pro přípravu knihoven KAPA™ Library Preparation Kit (KAPA™) nebo Qiaseq® FX DNA Library Kit (Qiagen®) jsme zjistili, že:

- Funkční způsobilost při použití sady SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 a přípravy knihovny KAPA™ je srovnatelná s funkční způsobilostí při použití sady SOPHiA GENETICS HCS v1.0 a přípravy knihovny KAPA™.
- Funkční způsobilost při použití soupravy SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 a přípravy knihovny Qiagen je rovněž srovnatelná s SOPHiA GENETICS HCS v1.0 a přípravou knihovny KAPA™.
- Analytická funkční způsobilost v nových oblastech, na které se zaměřuje SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 (APC CDS+-25bp), je vysoká.

Tabulka 6: Souhrn srovnání funkční způsobilosti sad

Č.	Měření funkční způsobilosti	Pozorováno	[spodních 95 % CI]**
1	Reprodukovatelnost KAPA™ v1.1 versus KAPA™ v1.0 (3 série na 59 vzorcích)	99,99%	[99,99%]
2	Reprodukovatelnost Qiagen® v1.1 versus KAPA™ v1.0 (3 série na 23 vzorcích)	99,99%	[99,99%]
3	Reprodukovatelnost KAPA™ (2 série na 24 vzorcích)	99,95%	[99,95%]
4	Reprodukovatelnost Qiagen® (2 série na 23 vzorcích)	99,99%	[99,99%]
5	Reprodukovatelnost KAPA™-Qiagen® (2 série na 23 vzorcích)	99,99%	[99,99%]

** 95% CI byly vypočteny pro všechny pozice u všech vzorků. Reprodukovatelnost vychází z replik.



7.7 ZÁVĚR

Na základě interně analyzovaných údajů dosáhla sada SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.1 podobné funkční způsobilosti jako předchozí SOPHiA DDM™ Dx HCS v1.0, pokud jde o míru zacílení, pokryté oblasti, uniformitu a detekci variant, a to jak se sadami pro přípravu knihoven KAPA™, tak Qiagen®. U nových oblastí zaměřených na gen APC vede kombinace přístroje Illumina MiSeq®, testu SOPHiA DDM™ Dx HCS a SOPHiA DDM™ k pozorované funkční způsobilosti 100 % citlivosti, 100 % specifičnosti, 100 % přesnosti a 100 % preciznosti. Celková reprodukovatelnost při použití sad pro přípravu knihoven KAPA™ nebo Qiagen® byla vyšší než 99,9 %.



8. SYMBOLY

Symbol	Název
	Přečtěte si návod k použití
	Katalogové číslo
	Kód šarže (číslo dávky)
	Upozornění
	Výrobce
	Teplotní limit
	Datum spotřeby
	Evropská shoda
	Zplnomocněný zástupce v Evropském společenství
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů
	Dovozce
	Datum výroby
	Viz Výstrahy a bezpečnostní opatření v „oddílu 5. Materiály a metody sady“
	Viz Výstrahy a bezpečnostní opatření v „oddílu 5. Materiály a metody sady“



9. PODPORA

V případě potíží s používáním režimu SOPHiA DDM™ Dx se podívejte do části věnované řešení problémů v uživatelské příručce k režimu SOPHiA DDM™ Dx, která je k dispozici v režimu SOPHiA DDM™ Dx, nebo se obraťte na naši podporu na telefonním čísle +41 21 694 10 60 nebo e-mailem na adrese support@sophiagenetics.com. Další podrobnosti naleznete na www.sophiagenetics.com. Podporu lze také kontaktovat prostřednictvím webové žádosti z obrazovky v části Podpora v režimu SOPHiA DDM™ Dx.



DODATEK 1. DESKY ADAPTÉRŮ S DUÁLNÍM INDEXEM

32 adaptérů s duálním indexem kompatibilních s Illumina®
v desce formátu 96 jamek (každá z nich 7 µl)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	701-502	701-503	701-504					
B	702-501	702-502	702-503	702-504					
C	703-501	703-502	703-503	703-504					
D	704-501	704-502	704-503	704-504					
E	705-501	705-502	705-503	705-504					
F	706-501	706-502	706-503	706-504					
G	707-501	707-502	707-503	707-504					
H	708-501	708-502	708-503	708-504					



48 adaptérů s duálním indexem kompatibilních s Illumina® v desce formátu 96 jamek (každá z nich 7 µl)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	703-502	705-503	707-501	709-502	711-503			
B	702-501	704-502	706-503	708-501	710-502	712-503			
C	703-501	705-502	701-504	709-501	711-502	707-504			
D	704-501	706-502	702-504	710-501	712-502	708-504			
E	705-501	701-503	703-504	711-501	707-503	709-504			
F	706-501	702-503	704-504	712-501	708-503	710-504			
G	701-502	703-503	705-504	707-502	709-503	711-504			
H	702-502	704-503	706-504	708-502	710-503	712-504			

96 adaptérů s duálním indexem kompatibilních s Illumina® v desce formátu 96 jamek (každá z nich 7 µl)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701-501	702-501	703-501	704-501	705-501	706-501	707-501	708-501	709-501	710-501	711-501	712-501
B	701-502	702-502	703-502	704-502	705-502	706-502	707-502	708-502	709-502	710-502	711-502	712-502
C	701-503	702-503	703-503	704-503	705-503	706-503	707-503	708-503	709-503	710-503	711-503	712-503
D	701-504	702-504	703-504	704-504	705-504	706-504	707-504	708-504	709-504	710-504	711-504	712-504
E	701-505	702-505	703-505	704-505	705-505	706-505	707-505	708-505	709-505	710-505	711-505	712-505
F	701-506	702-506	703-506	704-506	705-506	706-506	707-506	708-506	709-506	710-506	711-506	712-506
G	701-507	702-507	703-507	704-507	705-507	706-507	707-507	708-507	709-507	710-507	711-507	712-507
H	701-508	702-508	703-508	704-508	705-508	706-508	707-508	708-508	709-508	710-508	711-508	712-508



i5	i5 sekvence pro list vzorků
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	i7 sekvence pro list vzorků
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG



DODATEK 2. LABORATORNÍ VYBAVENÍ POUŽÍVANÉ V LABORATOŘI SOPHIA GENETICS

MATERIÁLY ZAJIŠTĚNÉ UŽIVATELEM	DODAVATEL	NÁZEV PRODUKTU	KATALOGOVÉ Č.
Proužky s 8 zkumavkami bez RNázy/DNázy (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific	EasyStrip Snap Tubes (Zkumavky EasyStrip Snap)	AB-2000
Zkumavky s nízkou vazbou DNA (1,5 ml)	Axygen	MaxyClear Microcentrifuges Tubes (Zkumavky pro mikro odstředivky MaxyClear)	MCT-175-C
Zkumavky (1,5 ml)	Eppendorf	Eppendorf Tubes (Zkumavky Eppendorf)	3810X
Kónické zkumavky (15 ml a 50 ml)	Falcon	15 ml & 50 ml Conical Centrifuge Tubes (Kónické zkumavky 15 ml a 50 ml pro odstředivky)	352096 a 352070
Filtrační hroty	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183-1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182-1730
Ethanol (úroveň jakosti pro molekulární biologii)	Merck	Ethanol Absolute	1.00983.1000

ZÓNA PŘED PCR	DODAVATEL	NÁZEV PRODUKTU	KATALOGOVÉ Č.
Vortexový mixér	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Stolní mikro odstředivka (kompatibilní s proužky s 8 zkumavkami)	Starlab	Mini Centrifuge (Mini odstředivka)	N2631-0007
Magnetický separační stojan typu 96 jamek	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Magnetický separační stojan typu 96 jamek	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (Boční magnet DynaMag-96)	12331D
Vícekanálové pipety (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Termocykler s programovatelným vyhříváním víkem	Biometra	TAdvanced 96	



ZÓNA PŘED PCR	DODAVATEL	NÁZEV PRODUKTU	KATALOGOVÉ Č.
Fluorometrické kvantifikační zařízení a reagens	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit (Fluorometr Qubit 3.0 a sada pro analýzu Qubit dsDNA HS)	Q33216 A Q32854
Jednokanálové pipety (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000

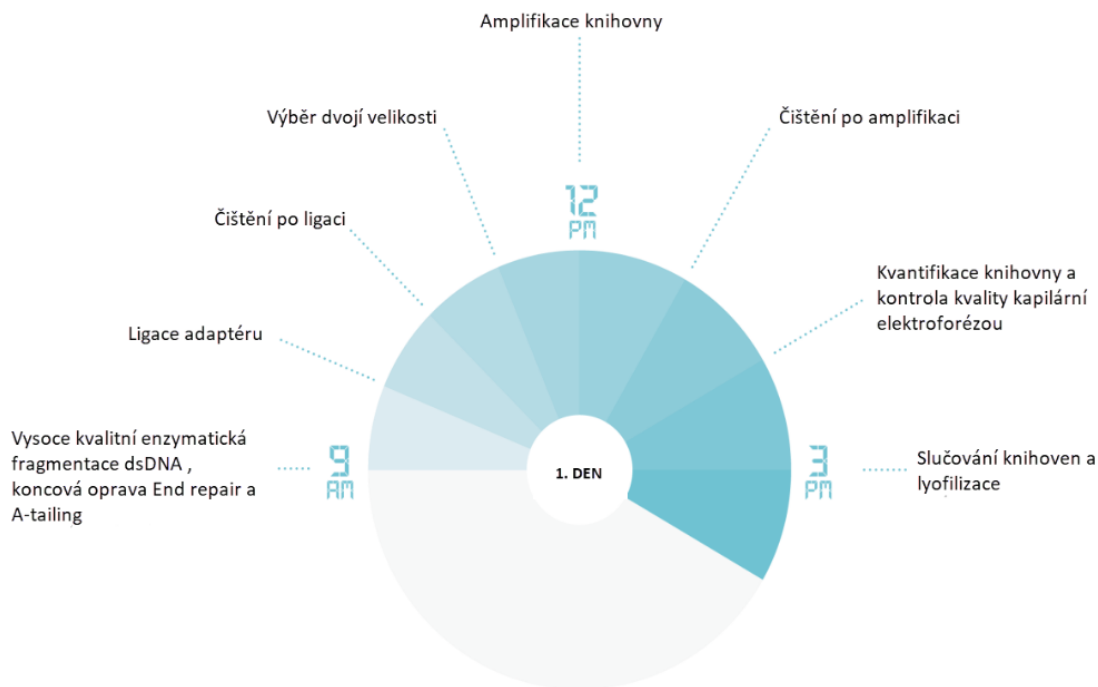
ZÓNA PO PCR	DODAVATEL	NÁZEV PRODUKTU	KATALOGOVÉ Č.
Termocykler s programovatelným vyhříváním víkem	Biometra	TAdvanced 96	
Systém kapilární elektroforézy	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Analyzátor fragmentů Agilent)	
Vakuový koncentrátor (SpeedVac™ nebo podobný)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Ohřívač suchých bloků nebo vodní lázeň (kompatibilní se zkumavkou 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Magnetický separační stojan (kompatibilní se zkumavkami 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	Separační stojan MagJET, 12 x zkumavka 1,5 ml	MR02
Magnetický separační stojan (typ 96 jamek)	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Magnetický separační stojan typu 96 jamek	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (Boční magnet DynaMag-96)	12331D
Vortexový mixér	Grant instrument	Multi-tube Vortex Mixer, V32 (Vícezkumavkový vortexový mixér, V32)	
Vortexový mixér	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Stolní mikro odstředivka (kompatibilní s proužky s 8 zkumavkami)	StarLab	Mini Centrifuge (Mini odstředivka)	N2631-0007
Vícekanálové pipety (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108-1100, S7108-3300
Fluorometrické kvantifikační zařízení a reagens	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer & Qubit dsDNA HS Assay kit (Fluorometr Qubit 3.0 a sada pro analýzu Qubit dsDNA HS)	Q33216 A Q32854



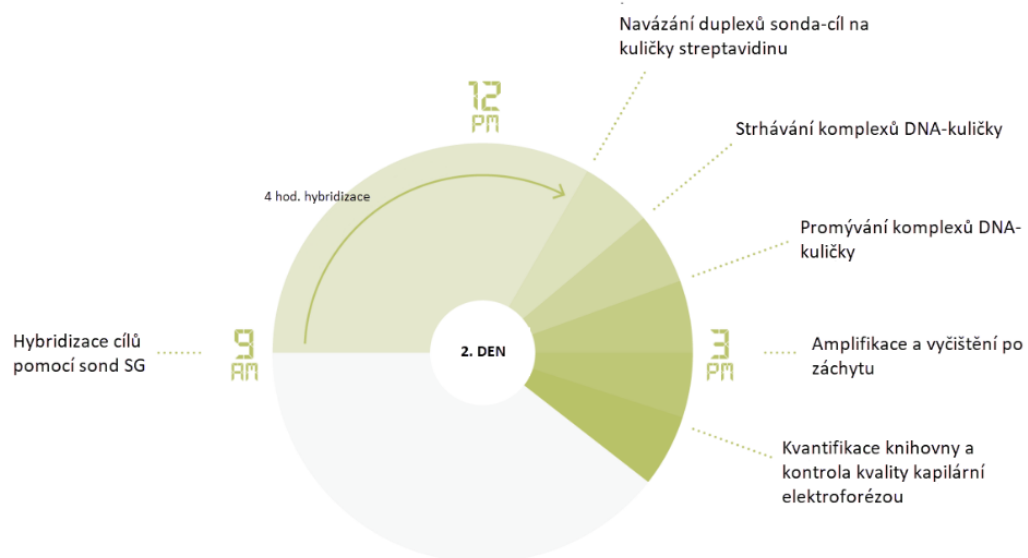
ZÓNA PO PCR	DODAVATEL	NÁZEV PRODUKTU	KATALOGOV É Č.
Jednokanálové pipety (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100-1100, S7100-2200, S7100-1000



DODATEK 3. OBECNÝ PRACOVNÍ POSTUP – ŘEŠENÍ ZÁCHYTU SOPHIA DDM™



Příprava knihovny Sada SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



ZÁCHYT

SNADNÝ PRACOVNÍ POSTUP

- MANIPULACE POUZE S 1-4 ZKUMAVKAMI (VÍCEČETNÉ SLOUČENÉ KNIHOVNY)
- POUZE 3 HODINY RUČNÍ PRÁCE



DODATEK 4. SEZNAM CÍLOVÝCH OBLASTÍ, POUŽITELNÝCH PROBLEMATICKÝCH A OZNAČENÝCH OBLASTÍ

CÍLOVÉ OBLASTI*

Cílové oblasti		
CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
1	45794953	45795134
1	45796163	45796254
1	45796829	45797031
1	45797067	45797253
1	45797308	45797546
1	45797670	45797783
1	45797813	45798007
1	45798038	45798185
1	45798221	45798384
1	45798410	45798531
1	45798565	45798656
1	45798744	45798867
1	45798932	45799021
1	45799060	45799300
1	45800038	45800208
1	45805866	45805951
2	47596620	47596745
2	47600577	47600734
2	47600922	47601212
2	47602348	47602463
2	47604128	47604241
2	47606067	47606218
2	47606883	47607069
2	47612280	47612374



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
2	47613686	47613777
2	47630306	47630566
2	47635515	47635719
2	47637208	47637536
2	47639528	47639724
2	47641383	47641582
2	47643410	47643593
2	47656871	47657105
2	47672662	47672821
2	47690145	47690318
2	47693772	47693972
2	47698079	47698226
2	47702139	47702434
2	47703481	47703735
2	47705386	47705683
2	47707810	47708035
2	47709893	47710113
2	48010348	48010657
2	48018041	48018287
2	48023008	48023227
2	48025725	48028319
2	48030534	48030849
2	48032024	48032191
2	48032732	48032871
2	48033318	48033522
2	48033566	48033815
2	48033893	48034024
2	215593375	215593757
2	215595110	215595257
2	215609766	215609908
2	215610421	215610603
2	215617146	215617304



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
2	215632181	215632403
2	215633931	215634061
2	215645259	215646258
2	215656996	215657194
2	215661760	215661866
2	215674111	215674318
3	37035014	37035179
3	37038085	37038225
3	37042421	37042569
3	37045867	37045990
3	37048457	37048579
3	37050280	37050421
3	37053286	37053378
3	37053477	37053615
3	37055898	37056060
3	37058972	37059115
3	37061776	37061979
3	37067103	37067523
3	37070250	37070448
3	37081652	37081810
3	37083734	37083847
3	37088985	37089199
3	37089983	37090125
3	37090370	37090533
3	37091952	37092169
3	178916589	178916990
3	178917453	178917712
3	178919053	178919353
3	178921307	178921602
3	178922266	178922401
3	178927358	178927513
3	178927949	178928151



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
3	178928194	178928378
3	178935973	178936147
3	178936959	178937090
3	178937334	178937548
3	178937712	178937865
3	178938749	178938970
3	178941844	178942000
3	178942463	178942634
3	178943725	178943853
3	178947035	178947255
3	178947767	178947934
3	178947988	178948189
3	178951857	178952177
4	84383597	84384080
4	84384622	84384786
4	84388582	84388716
4	84390160	84390329
4	84391331	84391574
4	84393350	84393466
4	84397771	84397857
4	84403282	84403422
4	84406114	84406250
5	112043390	112043604
5	112090563	112090747
5	112101998	112102132
5	112102861	112103112
5	112111301	112111459
5	112116462	112116625
5	112128118	112128251
5	112136951	112137105
5	112151167	112151315
5	112154638	112155066



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
5	112157568	112157713
5	112162780	112162969
5	112163601	112163728
5	112164528	112164694
5	112170623	112170887
5	112173225	112179848
5	131892992	131893170
5	131894951	131895084
5	131911444	131911645
5	131914984	131915219
5	131915529	131915783
5	131923229	131923407
5	131923591	131923806
5	131924354	131924597
5	131925298	131925554
5	131926891	131927123
5	131927544	131927751
5	131930536	131930761
5	131931240	131931527
5	131938967	131939206
5	131939587	131939763
5	131940473	131940716
5	131944282	131944442
5	131944784	131944926
5	131944950	131945113
5	131951670	131951751
5	131951754	131951847
5	131953737	131954011
5	131972782	131972917
5	131973748	131973940
5	131976339	131976522
5	131977845	131978081



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
7	6013005	6013198
7	6017194	6017413
7	6018202	6018352
7	6022430	6022647
7	6026365	6027276
7	6029406	6029611
7	6031579	6031713
7	6035140	6035289
7	6036932	6037079
7	6038714	6038931
7	6042059	6042292
7	6043296	6043448
7	6043578	6043714
7	6045498	6045687
7	6048603	6048675
7	6776682	6777592
7	6781291	6781508
7	6785694	6785844
7	6786642	6786861
7	6790855	6791257
7	152345702	152346473
7	152357761	152357892
7	152373101	152373189
8	90947785	90947865
8	90949229	90949328
8	90955456	90955619
8	90958343	90958548
8	90960027	90960145
8	90965447	90965944
8	90967486	90967808
8	90970928	90971107
8	90976613	90976760



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
8	90982567	90982810
8	90983376	90983543
8	90990423	90990576
8	90992937	90993146
8	90993578	90993776
8	90994925	90995108
8	90996728	90996814
10	89624202	89624330
10	89653757	89653891
10	89685245	89685339
10	89690778	89690871
10	89692745	89693033
10	89711850	89712041
10	89717585	89717801
10	89720626	89720900
10	89725019	89725254
11	94153266	94153372
11	94163052	94163177
11	94168973	94169090
11	94170318	94170426
11	94178951	94179084
11	94180360	94180629
11	94189417	94189529
11	94192549	94192772
11	94194077	94194227
11	94197254	94197430
11	94200954	94201084
11	94203612	94203833
11	94204715	94204950
11	94209430	94209594
11	94211876	94212067
11	94212815	94212952



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
11	94219065	94219275
11	94223974	94224156
11	94225923	94225992
11	108098327	108098448
11	108098478	108098640
11	108099880	108100075
11	108106372	108106586
11	108114655	108114870
11	108115490	108115778
11	108117666	108117879
11	108119635	108119854
11	108121403	108121824
11	108122539	108122783
11	108123519	108123664
11	108124516	108124791
11	108126917	108127092
11	108128183	108128358
11	108129688	108129827
11	108137873	108138094
11	108139112	108139361
11	108141766	108141898
11	108141953	108142158
11	108143234	108143359
11	108143424	108143604
11	108150193	108150360
11	108151697	108151920
11	108153412	108153631
11	108154929	108155225
11	108158302	108158467
11	108159679	108159855
11	108160304	108160553
11	108163321	108163545



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
11	108164015	108164229
11	108165629	108165811
11	108167989	108168134
11	108170416	108170637
11	108172350	108172541
11	108173555	108173781
11	108175377	108175604
11	108178599	108178736
11	108180862	108181067
11	108183113	108183250
11	108186525	108186663
11	108186713	108186865
11	108188075	108188273
11	108190656	108190810
11	108192003	108192172
11	108196012	108196296
11	108196760	108196977
11	108198347	108198510
11	108199723	108199990
11	108200916	108201173
11	108202146	108202309
11	108202581	108202789
11	108203464	108203652
11	108204588	108204720
11	108205671	108205861
11	108206547	108206713
11	108213924	108214123
11	108216445	108216660
11	108217981	108218117
11	108224468	108224632
11	108225513	108225626
11	108235784	108235970



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
11	108236027	108236260
13	32890573	32890689
13	32893189	32893487
13	32899188	32899346
13	32900213	32900312
13	32900354	32900444
13	32900611	32900775
13	32903555	32903654
13	32905031	32905192
13	32906384	32907549
13	32910377	32915358
13	32918670	32918815
13	32920939	32921058
13	32928973	32929450
13	32930540	32930771
13	32931854	32932091
13	32936635	32936855
13	32937291	32937695
13	32944514	32944719
13	32945068	32945262
13	32950782	32950953
13	32953429	32953677
13	32953862	32954075
13	32954119	32954307
13	32968801	32969095
13	32971010	32971206
13	32972274	32972932
16	23614755	23615015
16	23619160	23619358
16	23625300	23625437
16	23632667	23632824
16	23634265	23634476



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
16	23635305	23635440
16	23637532	23637743
16	23640500	23640621
16	23640936	23641815
16	23646158	23647680
16	23649146	23649298
16	23649366	23649475
16	23652406	23652503
16	68771294	68771391
16	68772175	68772339
16	68835548	68835821
16	68842302	68842495
16	68842571	68842776
16	68844075	68844269
16	68845562	68845787
16	68846013	68846191
16	68847191	68847423
16	68849393	68849687
16	68853158	68853353
16	68855879	68856153
16	68857277	68857554
16	68862052	68862232
16	68863532	68863725
16	68867168	68867427
17	7572902	7573033
17	7573902	7574058
17	7576568	7576682
17	7576828	7576951
17	7576994	7577180
17	7577474	7577633
17	7578152	7578314
17	7578346	7578579



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
17	7579287	7579615
17	7579675	7579746
17	7579814	7579937
17	33427947	33428080
17	33428195	33428409
17	33430248	33430368
17	33430448	33430588
17	33433380	33433525
17	33433982	33434166
17	33434360	33434491
17	33443909	33444081
17	33445495	33445663
17	33446105	33446216
17	33446526	33446657
17	41197670	41197844
17	41199635	41199745
17	41201113	41201236
17	41203055	41203159
17	41209044	41209177
17	41215325	41215415
17	41215866	41215993
17	41219600	41219737
17	41222920	41223280
17	41226323	41226563
17	41228480	41228656
17	41231326	41231441
17	41234396	41234617
17	41242936	41243074
17	41243427	41246902
17	41247838	41247964
17	41249236	41249331
17	41251767	41251922



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
17	41256114	41256303
17	41256860	41256998
17	41258448	41258575
17	41267718	41267821
17	41276009	41276138
17	56769980	56770174
17	56772267	56772579
17	56774029	56774245
17	56780532	56780715
17	56787195	56787376
17	56798082	56798198
17	56801376	56801486
17	56809820	56809930
17	56811454	56811608
17	59760632	59761526
17	59763172	59763551
17	59770766	59770898
17	59793287	59793449
17	59820349	59820520
17	59821768	59821977
17	59853737	59853948
17	59857597	59857787
17	59858176	59858391
17	59861606	59861810
17	59870933	59871115
17	59876436	59876685
17	59878589	59878860
17	59885803	59886143
17	59924437	59924606
17	59926465	59926642
17	59934394	59934617
17	59937132	59937293



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
17	59938783	59938925
19	1206888	1207227
19	1218391	1218524
19	1219298	1219431
19	1220347	1220529
19	1220555	1220741
19	1221187	1221364
19	1221923	1222030
19	1222959	1223196
19	1226428	1226671
22	29083860	29083999
22	29085098	29085228
22	29089995	29090130
22	29091090	29091255
22	29091673	29091886
22	29092864	29093000
22	29095801	29095950
22	29099468	29099579
22	29105969	29106072
22	29107872	29108030
22	29115358	29115498
22	29120940	29121137
22	29121206	29121380
22	29130366	29130734

*Cílová oblast je místo, kde pipeline hlásí varianty s vysokou spolehlivostí, pokud jsou přítomny. Základem souřadnic je 1 a koncová souřadnice je zahrnuta do oblasti.



PŘÍSLUŠNÉ PROBLEMATICKÉ OBLASTI**

CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC
chr2	48018282	48018315
chr3	37067075	37067120
chr5	112111309	112111311
chr11	94152620	94152662
chr17	59757835	59757859

**Problematickou oblastí je určitá intronická oblast v rámci cíle, která by mohla způsobit určitou nejistotu při hlášení variant. Mohlo by to souviset s technologií sekvenování. Varianta detekovaná v této oblasti bude v tabulce spolehlivosti v SOPHiA DDM™ zařazena do kategorie „Nízká“. Příslušný sloupec filtru varianty v konečné tabulce úplných variant bude označen jako „problematické oblasti“. Základem souřadnic je 1 a koncová souřadnice je zahrnuta do oblasti.

PŘÍSLUŠNÉ OZNAČENÉ REGIONY***

Příslušné označené regiony

CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC	POPIS
2	47635515	47635560	varianty v této oblasti mohou být rušeny artefakty sekvenování.
2	48032732	48032820	varianty v této oblasti mohou být rušeny artefakty sekvenování.
3	37067103	37067240	varianty v této oblasti mohou být rušeny artefakty sekvenování.
7	6036932	6037079	varianty v této oblasti mohou být rušeny artefakty sekvenování.
3	178937334	178937548	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je chr22:17053913- 17054324, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
3	178937712	178937865	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je chr22:17054288- 17054442, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6012845	6013198	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v pseudogenu PMS2CL, chr7:6790854-6791209, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6017194	6017413	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v pseudogenu PMS2CL, chr7:6786641-6786861, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6018202	6018352	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v pseudogenu PMS2CL, chr7:6785693-6785844,



CHROMOZOM	ZAČÁTEK	KONEC	POPIS
			hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6022430	6022647	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v pseudogenu PMS2CL, chr7:6781290-6781508, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6026365	6027276	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v pseudogenu PMS2CL, chr7:6776681-6777592, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6776682	6777592	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v genu PMS2, chr7:6026364-6027276, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6781291	6781508	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s nejvyšší podobností je v genu PMS2, chr7:6022429-6022647, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6785694	6785844	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s nejvyšší podobností je v genu PMS2, chr7:6018201-6018352, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6786642	6786861	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v genu PMS2, chr7:6017193-6017413, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
7	6790855	6791257	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je v genu PMS2, chr7:6012796-6013198, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně.
22	29085098	29085228	oblast je velmi podobná jiné genomové oblasti (oblast s největší podobností je chr16:33366704-33366835, hg19/GRCh37) – k interpretaci variant je třeba přistupovat opatrně

***Označená oblast je určitá oblast překrývající exon, která by mohla způsobit určitou nejistotu při hlášení variant, např. oblast s nízkou složitostí, šumem, pseudogeny atd. Mohlo by to záviset na technologii sekvenování. Varianta detekovaná v této oblasti nebude v systému SOPHiA DDM™ klasifikována jako varianta s nízkou spolehlivostí, ale bude k ní přidružen výstražný trojúhelník a na kartě výstrah naleznete podrobnou výstražnou zprávu. Odpovídající sloupec filtru varianty v konečné tabulce úplných variant nebude kvůli této oblasti označený. Základem souřadnic je 1 a koncová souřadnice je zahrnuta do oblasti.



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:13:03 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:55:49 GMT+0000