

Agendia NV.

# MammaPrint® ve BluePrint® Meme Kanseri Nüksü ve Moleküler Alt Tipleme Kiti ve ADAPT Yazılımı - Kullanım Talimatı

*Meme kanseri nüks riskini ve moleküler alt tipini değerlendirmek için  
formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü doku kesitlerinden elde edilen  
RNA'dan hedefli dizileme*



**AGENDIA®**  
**MAMMAPRINT+BLUEPRINT**

Belge No: **MKT-339-v7-TR**

Bu belgeyi diğer dillerde görüntülemek için lütfen şu adrese gidin: <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/>

## İçindekiler

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Amaçlanan Kullanım/Amaç.....                                                                                    | 3  |
| Testin Özeti ve Açıklaması.....                                                                                 | 4  |
| Ölçüm ve tespiti yapılanlar .....                                                                               | 4  |
| Prosedürün İlkesi .....                                                                                         | 4  |
| Reaktifler .....                                                                                                | 5  |
| Temin Edilen Reaktifler .....                                                                                   | 5  |
| Gerekli Olup Temin Edilmeyen Reaktifler ve Ekipman .....                                                        | 6  |
| Uyarılar ve Önlemler .....                                                                                      | 7  |
| Depolama ve Kullanım .....                                                                                      | 8  |
| Numune Toplama ve Analiz için Hazırlama.....                                                                    | 9  |
| Kalite Kontrolü .....                                                                                           | 9  |
| Analitik Kalite Değerlendirmesi.....                                                                            | 9  |
| QC 1: Saflaştırılmış, FFPE toplam RNA'sının kalite değerlendirme.....                                           | 9  |
| QC 2: Amplifiye edilmiş, adaptöre bağlı cDNA kütüphanelerinin kalite değerlendirme.....                         | 9  |
| QC 3: Amplifiye edilmiş, hedef açısından zenginleştirilmiş, indekslenmiş kütüphanenin kalite değerlendirme..... | 9  |
| Tayin Kontrolleri.....                                                                                          | 10 |
| Test Prosedürü .....                                                                                            | 10 |
| 1. Adım: FFPE RNA Kalite Değerlendirmesi ve Hazırlama .....                                                     | 11 |
| 2. Adım: Agendia NGS Kütüphanesi Hazırlanması .....                                                             | 11 |
| 3. Adım: Agendia NGS Hedef Zenginleştirme .....                                                                 | 16 |
| QC 3: Amplifiye edilmiş, hedef açısından zenginleştirilmiş, indekslenmiş kütüphanenin kalite değerlendirme..... | 20 |
| 4. Adım: Agendia NGS MiSeq'e Yükleme .....                                                                      | 21 |
| 5. Adım: ADAPT aracılığıyla FASTQ dosyalarının analizi.....                                                     | 23 |
| Sonuçlar .....                                                                                                  | 24 |
| Sonuçların Yorumlanması .....                                                                                   | 24 |
| MammaPrint .....                                                                                                | 24 |
| BluePrint .....                                                                                                 | 25 |
| Prosedürün Sınırlamaları .....                                                                                  | 25 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Beklenen Değerler.....                                                     | 26 |
| MammaPrint .....                                                           | 26 |
| Blueprint .....                                                            | 26 |
| Performans Özellikleri.....                                                | 27 |
| MammaPrint .....                                                           | 27 |
| Blueprint .....                                                            | 28 |
| Yardım .....                                                               | 30 |
| Düzenlendiği Tarihi .....                                                  | 30 |
| Tavsiye Bildirimi: .....                                                   | 31 |
| Bibliyografya .....                                                        | 34 |
| Ek A: MammaPrint Blueprint NGS 8 bp İndekslerinin Nükleotid Dizileri ..... | 36 |

## Amaçlanan Kullanıcı

### **Profesyonel laboratuvar kullanımı içindir.**

Testin rutin olarak yapılabilmesi için laboratuvarlar önce Agendia'nın eğitim ve oryantasyon programına tabi tutulacaktır. Programın başarılı bir şekilde tamamlanmasının ardından bir sertifika verilecektir.

### **KULLANMADAN ÖNCE TÜM TALİMATLARI DİKKATLİCE OKUYUN.**

## Amaçlanan Kullanım/Amaç

MammaPrint BluePrint Meme Kanseri Nüksü ve Moleküler Alt Tipleme Kiti, bir hastanın uzak metastaz riskini değerlendirmek ve moleküler alt tipin belirlenmesi amacıyla formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) meme kanseri doku örneklerinde gen ekspresyonunu değerlendirmek için klinik laboratuvarlar tarafından kullanılmaya yönelik, hedef zenginleştirmeli yeni nesil dizileme (NGS) kullanan, kalitatif, otomatik olmayan bir in vitro bir tanı testidir. Bu cihaz sadece profesyonel laboratuvar kullanımı içindir.

MammaPrint ve BluePrint, meme kanseri olan hastalarda tedavi kararlarına rehberlik etmek için sistemik tedavi yararının büyüklüğünün tahmini ile ilgili bilgi sağlar.

MammaPrint ve BluePrint genleri, kanserin ayırt edici temel özelliklerinden olarak hayatta kalma, çoğalma, yayılma ve metastaz yapmaya yönelik olarak meme kanseri hücrelerinin çoklu aşamalı gelişiminin karakteristik özelliklerini ölçer [1].

MammaPrint testi, 70 genli olup tanıdan sonraki 5 yıl içinde uzak metastaz gelişmesi bakımından Düşük Risk veya Yüksek Risk altında olan hastaları ayırt etmeyi amaçlamaktadır [2] [3] [4]. BluePrint 80 gen testi, meme kanserinin moleküler alt tipini değerlendirmeyi ve tümörlerin Luminal Tip, HER2 Tipi veya Bazal Tip olup olmadığını belirlemeyi amaçlamaktadır [5].

MammaPrint ve Blueprint NGS Kiti, kadın meme kanseri hastalarından lenf nodu negatif veya en fazla 3 pozitif lenf nodu olan 1. evre veya 2. evre hastalığı olan, tümör boyutu 5,0 cm'den küçük veya eşit olanlar ve 3. evre hastalığı olan hastalar için uygulanır. MammaPrint ve BluePrint sonuçları, diğer klinikopatolojik faktörlerle birlikte doktorlar tarafından kullanılmak üzere endikedir [6]. MammaPrint BluePrint NGS Kiti, Illumina® MiSeq® Dizileme Sistemi üzerinde gerçekleştirilir ve sonuçlar Agendia Veri Analizi Aracı (ADAPT) kullanılarak analiz edilir.

## Testin Özeti ve Açıklaması

### Ölçüm ve tespiti yapılanlar

MammaPrint Blueprint NGS Kiti, bireyselleştirilmiş Düşük veya Yüksek hastalık nüksü Riski sonucunun yanı sıra bir tümörün moleküler alt tipinin kişiselleştirilmiş şekilde belirlenmesini sağlar.

MammaPrint, bir tümör örneğindeki 70 genin aktivitesini belirler ve bunun sonucu olarak da tümörün bir ekspresyon profili veya “parmak izi” çıkar. Tescilli bir algoritma kullanarak, gen ekspresyon profili, meme kan serinin nüks riskine yönelik prognostik profili gösteren MammaPrint indeksini (MPI) hesaplamak için kullanılır.

Blueprint, bir tümör örneğindeki 80 genin aktivitesini belirler ve sonuç olarak üç ekspresyon profili çıkarır. Tescilli bir algoritma kullanılarak, gen ekspresyon profilleri, numunenin moleküler alt tipini belirlemek için kullanılan Blueprint indekslerini hesaplamak için kullanılır: Luminal Tip, HER2 Tipi veya Bazal Tip. MammaPrint Blueprint NGS Kiti için kullanılan genler ve puanlama algoritmaları, Agendia'nın Teşhis Hizmeti Laboratuvarı'nda mikrodizi üzerinde gerçekleştirilen MammaPrint ve Blueprint testi için kullanılanlarla aynıdır ( [2] [3] [4] [7] [8] [9]).

### Prosedürün İlkesi

MammaPrint Blueprint NGS Kiti, tümör hücresi içeriği en az %30 olan FFPE dokusundan izole edilen RNA'da gen ekspresyonunu belirlemek için yakalama dizileme kullanan otomatik olmayan bir laboratuvar sürecidir.

NGS Kiti, ribozom tüketme adımı olmaksızın Agilent SureSelect<sup>XT</sup> RNA hedef zenginleştirme sistemini kullanarak FFPE RNA'dan elde edilen hedeflenen NGS kütüphanelerinin hazırlanmasını sağlar. Hedef zenginleştirme iş akışı, MammaPrint ve Blueprint genlerini yakalamak için ultra uzun 120'lik biyotinillenmiş cRNA yemlerini kullanır ve bir NGS genomik fragman kütüphanesi içinden bunları zenginleştirir. Dizileme çıktısından (FASTQ formatında) oluşturulan okuma sayısı verileri, MammaPrint ve Blueprint profillerinin ekspresyon seviyelerini değerlendirmek ve test sonuçlarını raporlamak için kullanılır.

Dizileme çıktısı Agendia'nın web portalına güvenli bir şekilde aktarılır ve analiz, Agendia Veri Analizi Aracı (ADAPT) kullanılarak gerçekleştirilir. MammaPrint test sonucu, -1,000 ila +1,000 arasında bir ölçekte rapor edilen ve numunenin prognostik profilini belirleyen MPI'yi içerir: Düşük Risk (MPI +0,000'den büyük) veya Yüksek Risk (MPI 0,000'e eşit veya daha az). Blueprint test sonuçları ise üç tane Blueprint indeksi içerir ve en yüksek indeks numunenin moleküler alt tipini belirler.

## Reaktifler

### Temin Edilen Reaktifler

Katalog no. 931280 en fazla 16 reaksiyon için yapılandırılmıştır.

| <b>MammaPrint Blueprint NGS RNA Kütüphanesi Hazırlanması (PCR öncesi)</b><br>Katalog no. 931281 [Kutu 1/4] |             | -15°C<br>ila<br>-25°C |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|
| Bileşen                                                                                                    | Katalog no. | Hacim                 |
| Agendia NGS Fragmanlara Bölme Karışımı                                                                     | 931281-01   | 304 µl                |
| Agendia NGS 1. Zincir Ana Karışımı                                                                         | 931281-02   | 140 µl                |
| Agendia NGS 2. Zincir + Uç Onarımı Enzim Karışımı                                                          | 931281-03   | 400 µl                |
| Agendia NGS 2. Zincir + Uç Onarımı Oligo Karışımı                                                          | 931281-04   | 80 µl                 |
| Agendia NGS dA Kuyruk Ekleme Ana Karışımı                                                                  | 931281-05   | 320 µl                |
| Agendia NGS Oligo Adaptör Karışımı                                                                         | 931281-06   | 80 µl                 |
| Agendia NGS Ligasyon Ana Karışımı                                                                          | 931281-07   | 80 µl                 |
| Agendia NGS İleri Yönlü PCR Primeri                                                                        | 931281-08   | 60 µl                 |
| Agendia NGS PCR Ana Karışımı                                                                               | 931281-09   | 800 µl                |
| Agendia NGS Urasil DNA Glikosilaz (UDG)                                                                    | 931281-10   | 16 µl                 |
| Agendia NGS Ters Yönlü PCR Primer                                                                          | 931281-11   | 16 µl                 |
| Agendia NGS Nükleazsız Su                                                                                  | 931282-07   | 2,4 ml                |

| <b>MammaPrint Blueprint NGS Hedef Zenginleştirme (PCR Sonrası 2. Kutu)</b><br>Katalog no. 931283 [Kutu 3/4] |             | -15°C<br>ila<br>-25°C |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------|
| Bileşen                                                                                                     | Katalog no. | Hacim                 |
| Agendia NGS İndeksleme Bloku 1                                                                              | 931283-01   | 45 µl                 |
| Agendia NGS Bloku 2                                                                                         | 931283-02   | 45 µl                 |
| Agendia NGS İndeksleme Bloku 3                                                                              | 931283-03   | 12 µl                 |
| Agendia NGS RNaz Bloku                                                                                      | 931283-04   | 18 µl                 |
| Agendia NGS Hyb 3                                                                                           | 931283-05   | 160 µl                |
| Agendia NGS Başlık Sonrası PCR Primeri                                                                      | 931283-06   | 16 µl                 |
| Agendia NGS PCR Ana Karışımı                                                                                | 931281-09   | 800 µl                |
| Agendia NGS 8 bp İndeks Plakası*                                                                            | 931283-07   | 12 µl                 |

| <b>MammaPrint Blueprint NGS Hedef Zenginleştirme (PCR Sonrası 1. Kutu)</b><br>Katalog no. 931282 [Kutu 2/4] |             | 15°C<br>ila<br>30°C |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|
| Bileşen                                                                                                     | Katalog no. | Hacim               |
| Agendia NGS Hyb 1                                                                                           | 931282-01   | 400 µl              |
| Agendia NGS Hyb 2                                                                                           | 931282-02   | 1,25 ml             |
| Agendia NGS Hyb 4                                                                                           | 931282-03   | 1,25 ml             |
| Agendia NGS Bağlama Tamponu                                                                                 | 931282-04   | 13,2 ml             |
| Agendia NGS Yıkama Tamponu 1                                                                                | 931282-05   | 8 ml                |
| Agendia NGS Yıkama Tamponu 2                                                                                | 931282-06   | 24 ml               |
| Agendia NGS Nükleazsız Su                                                                                   | 931282-07   | 2,4 ml              |
| Agendia NGS Elüsyon Tamponu                                                                                 | 931282-08   | 5,8 ml              |
| Agendia NGS Nötralizasyon Tamponu                                                                           | 931282-09   | 960 µl              |
| MammaPrint Blueprint Paket Eklentisi                                                                        | 931282-10   | 1x                  |

| <b>MammaPrint Blueprint NGS Paneli</b><br>Katalog no. 931284 [Kutu 4/4] |             | -75°C ila<br>-85°C |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------|
| Bileşen                                                                 | Katalog no. | Hacim              |
| MammaPrint Blueprint NGS Yemleri Kütüphanesi                            | 931284      | 36 µl              |

\* İndeks dizileri için bkz. [Ek A: MammaPrint Blueprint NGS İndesklerinin Nükleotid Dizileri](#)

## Gerekli Olup Temin Edilmeyen Reaktifler ve Ekipman

| Reaktif                                   | Üretici, Katalog Numarası                                                       |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| RNA İzolasyon RNeasy FFPE Kiti            | QIAGEN, 73504                                                                   |
| Aktinomisin D                             | Streptomyces suşlarından (Sigma Aldrich, A1410)                                 |
| Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1         | Invitrogen, 65601 veya 65602                                                    |
| Agencourt AMPure XP                       | Beckman Coulter Genomics, A63880 veya A63881 veya A63882                        |
| MiSeq Reaktif Kiti v3 Kiti (150 döngülük) | Illumina, MS-102-3001                                                           |
| PhiX Kontrol Kiti V3                      | Illumina, FC-110-3001                                                           |
| Dimetil sülfoksit                         | Moleküler biyoloji sınıfı (Sigma-Aldrich, D8418)                                |
| EB Tamponu                                | QIAGEN, 19086                                                                   |
| Etanol (EtOH), %100                       | Moleküler Biyoloji sınıfı (VWR, 1085430250)                                     |
| Tween 20                                  | İyonik olmayan (Sigma-Aldrich, P7949)                                           |
| Nükleaz içermeyen su                      | Nükleaz içermeyen, deiyonize, kimyasal katkı maddesi içermeyen (QIAGEN, 129114) |
| Sodyum hidroksit (NaOH)                   | 1N, Moleküler Biyoloji sınıfı (Sigma-Aldrich, 72068)                            |
| Ksilen                                    | Kullanılabilir herhangi biri                                                    |
| Histo-Clear                               | National Diagnostics, HS-200                                                    |

| Ekipman                                           | Minimum Özellikler                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nükleik asit analiz platformu ve sarf malzemeleri | RNA DV200 200 nt-4000 nt<br>DNA 150 bp-550 bp (Kantitatif duyarlılık 0,5-50 ng/µl)<br>DNA 150 bp-700 bp (Kantitatif duyarlılık 5-500 pg/ µl)                              |
| Vorteks karıştırıcı                               | Kullanılabilir herhangi biri                                                                                                                                              |
| Santrifüj                                         | 1,5 ml/0,5 ml tüpler için                                                                                                                                                 |
| Plaka santrifüjü                                  | 0,8 ml MIDI plakalara uygun                                                                                                                                               |
| Vakum santrifüjü                                  | Sıcaklık aralığı: 15°C ila 45°C                                                                                                                                           |
| Isı blokları                                      | 0,8 ml MIDI plaka için 37°C                                                                                                                                               |
| Isıl karıştırıcı                                  | 27°C ve 65°C                                                                                                                                                              |
| Süre ölçer                                        | NIST izlenebilir                                                                                                                                                          |
| Manyetik stand                                    | 0,80 ml plakalara uygun (Life Technologies, AM10027)<br>0,2 ml 8'li şerit tüplere uygun (Life Technologies, 12331D)<br>1.5/2 ml tüplere uygun (Life Technologies, 12321D) |
| Isıl döngüleyici                                  | Isıtmalı kapak: 105°C                                                                                                                                                     |
| Tek kanallı pipetler                              | 1 µl — 1000 µl                                                                                                                                                            |
| 8'li şerit tüpler/tüp çevirici                    | Kullanılabilir herhangi biri                                                                                                                                              |
| Çok kanallı pipetler (isteğe bağlı)               | 1 µl — 1000 µl                                                                                                                                                            |
| Tekrarlayıcı pipetler (isteğe bağlı)              | 1 µl — 10 ml                                                                                                                                                              |
| MiSeq sistemi                                     | Illumina, SY-410-1003 veya<br>Illumina, DX-410-1001 RUO modu                                                                                                              |

\*Not: Yukarıda listelenen reaktifler ve genel ekipman, MammaPrint Blueprint NGS Kiti ile birlikte kullanılmak üzere Agendia tarafından geçerlenmiştir. Bu doğrulamalar, bu reaktiflerin, genel ekipmanın ve NGS Kitinin kombinasyonunun güvenli ve performanslı bir kombinasyon olduğunu göstermiştir (bkz. Performans Özellikleri bölümü).

## Uyarılar ve Önlemler

- *In vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.
- Bu cihaz, yalnızca Agendia tarafından eğitilmiş ve onaylanmış profesyonel laboratuvarlar tarafından kullanılmalıdır.
- MammaPrint BluePrint Meme Kanseri Nüksü ve Moleküler Alt Tipleme Kiti tarafından sağlanan sonuçlar, standart klinikopatolojik faktörlerle birlikte doktorlar tarafından kullanılmak üzere endikedir. Test, hastalığın akıbetini belirlemek için tasarlanmamıştır.
- Cihazı, Formalinle Sabitlenmiş Parafine Gömülü (FFPE) kadın meme kanseri doku örnekleri ile kullanın.
- Kit içeriğini kutunun dışında yazılı son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Farklı kit lotlarından tayin bileşenlerini birbiriyle değiştirmeyin. Kit lotlarının dış kutu etiketinde tanımlandığını unutmayın.
- Kit bileşenlerini bu amaca ayrılmış amplifikasyon öncesi ve amplifikasyon sonrası alanlarda belirtilen sıcaklıklarda saklayın.
- Doğru sonuçlar elde etmek için Test Prosedürü talimatlarını tam olarak izlemeniz gerekir. Talimatlara uyulmaması, test sistemi talimatlarında değişiklik yapılması, Agendia tarafından önerilmeyen reaktiflerin veya aletlerin ya da analiz ve raporlama araçlarının kullanılması test sonuçlarını geçersiz kılabilir. Deparafinizasyon, RNA izolasyonu, hedef zenginleştirme veya dizileme talimatlarına uyulmaması test sonuçlarını geçersiz kılabilir.
- Geçerli sonuçlar elde etmek için gerekli olması nedeniyle, invaziv tümör hücre yüzdesinin en az %30 olması gerekir.
- Numune muntazamlığını sağlamak için uygun laboratuvar doku/numune tanımlama işlemleri uygulanır.
- Yetersiz veya düşük kaliteli RNA yanlış sonuçlar verebilir.
- RNA izolasyonu veya yeni nesil dizileme prosedürleri konusunda deneyiminiz yoksa özel eğitim veya rehberlik talebinde bulunun.
- Çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/> adresinde bulunan Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.
- Rutin laboratuvar önlemlerini kullanın. Ağzla pipetleme yapmayın. Laboratuvar çalışma alanları olarak ayrılan yerlerde yemek yemeyin, içmeyin ve sigara içmeyin. Numuneleri ve test reaktiflerini tutarken tek kullanımlık eldivenler ve laboratuvar önlükleri giyin. Numuneleri ve tayin reaktiflerini kullandıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Aktinomisin D katı olarak elde edilir ve DMSO içinde 4 µg/µl konsantrasyonda hazırlanır, daha sonra 3 µl tek kullanımlık alikotlar halinde, —20°C'de, ışıktan korunarak saklanır. Alikotlar kullanımdan önce bir yıla kadar saklanabilir. DMSO içindeki 4 µg/µl Aktinomisin D, kullanımdan hemen önce su ile seyreltilir; nihai Aktinomisin D konsantrasyonu 120 ng/µl olacak şekilde seyreltilir.
- NOT: Prosedürün 2. adımında kullanılan aktinomisin D tehlikelidir; akut toksisite: oral, dermal ve  inhalasyon.
- Laboratuvarda çalışırken uygun kişisel koruyucu ekipman (KKD) kullanın.





## Depolama ve Kullanım

Kit içeriği, dış kutu etiketinde yazılı son kullanma tarihine kadar stabildir.

Her kutuyu aşağıdaki sıcaklıklarda saklayın:

- 1. Kutu ve 3. Kutu: -15°C ile -25°C arasında
- 2. Kutu: 15°C ile 30°C arasında. Doğrudan güneş ışığından uzak tutun.
- 4. Kutu: -75°C ile -85°C arasında

Cihaz maksimum 16 reaksiyon için kullanılabilir. Reaktifler, kutu üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden önce meydana gelen maksimum 5 dondurma/çözündürme döngüsü için stabildir.

Test, laboratuvar da oda sıcaklığı koşullarında (15°C ile 25°C arasında) yapılmalıdır.

Kullanmadan önce vorteksle kuvvetli bir şekilde karıştırın ve ardından çökelti olmadığından emin olmak için gözle inceleyin.

Her gün taze olarak 0,2 N NaOH hazırladığınızdan emin olun; oda sıcaklığında saklandığında 12 saate kadar stabildir.

Günlük %70 etanolü taze olarak hazırlayın.

PCR Clean-Up AMPure XP Boncukları ve Kütüphane Streptavidin Boncuklarını işlerken aşağıdaki en iyi uygulamalara uyun:

- PCR Clean-Up AMPure XP Boncuklarının asla dondurulmaması gerekir
- AMPure XP Boncuklarının kullanımdan önce en az 30 dakika oda sıcaklığına ulaşmasına izin verin
- Kullanmadan hemen önce, boncukları iyi bir süspansiyon oluşana ve renk homojen görüne kadar vorteksle karıştırın
- Streptavidin boncukları eklendikten sonra numuneyi 10 kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırın
- Boncuk/numune karışımını belirtilen süre boyunca oda sıcaklığında bekletin

PCR kontaminasyonu yanlış ve güvenilir sonuçlara neden olabilir. Kontaminasyonu önlemek için, amplifikasyon öncesi ve amplifikasyon sonrası alanların alana özel ekipmanları (örneğin pipetler, pipet uçları, vorteks ve santrifüj) içerdiğinden emin olun.

Çapraz kontaminasyondan kaçının. Numuneler arasında ve reaktifleri dağıtırken aralarında yeni pipet uçları kullanın. Numuneleri bir pipetle karıştırın ve belirtildiğinde plakayı santrifüjleyin. Aksi belirtilmedikçe plakaları vorteksle karıştırmayın. Amplikon taşınması ve numuneden numuneye çapraz kontaminasyon riskini azaltmak için aerosole dayanıklı uçlar kullanın.

## Atık işlemleri

Kullanılmış reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel yasa ve yönetmeliklere uygun olarak atın. Çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için <https://diagnostic-products.agendia.com/resources/> adresinde bulunan Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.

Cihaz doku, hücre; hayvan, insan veya mikrobiyal kökenli maddeler içermez.

## Numune Toplama ve Analiz için Hazırlama

Fiksasyondan önceki doku elleçleme profesyonel laboratuvar protokolüne göre yönetilmelidir.

Takibi yapılacak her numune için en fazla miktarda invaziv karsinom içeren ve sunulan tanı ile morfolojik olarak tutarlı olan bir doku örneği kullanılarak bir FFPE kadın meme kanseri dokusu tümör bloku seçin. Seçilen FFPE tümör bloku 5 yıldan eski olmamalıdır. Numunenin süreç boyunca benzersiz bir şekilde tanımlandığından emin olun.

FFPE numunesinin depolanması profesyonel laboratuvar protokolüne göre yapılmalıdır.

Daha sonra, her doku bloku için, her lamda bir tane 5 µm seri kesit olacak şekilde 5 µm'lik 10 adet lam kesiti alınmalıdır. Kesitlerin Bölümlerin lamdan düşme olasılığını azaltmak için yüklü lamların kullanılması önerilir. Tümör hücre yüzdesini belirlemek için hematoksilin ve eozin (H&E) boyaması için bir lam kullanılacak ve dokunun boyutuna bağlı olarak kalan lamlar tamamen veya kısmen RNA izolasyonu için kullanılabilir. Deparafinizasyonun Ksilen veya Histo-Clear kullanılarak yapılması gerekir.<sup>1</sup>

Geçerli sonuçlar elde etmek için gerekli olduğundan invaziv tümör hücre yüzdesi en az %30 olmalıdır. Gerektiğinde ve mümkün olduğunda, genel invaziv tümör hücre yüzdesini azaltacağından, geniş *in-situ* karsinom, nekroz, yağ dokusu, stroma ve/veya kanama alanlarından kaçınmak için bir mikro diseksiyon yapılabilir.

## Kalite Kontrolü

Laboratuvarınızın standart Kalite Kontrol (QC) gerekliliklerine uygun olarak laboratuvar proseslerinde kullanılan ekipmanlarda uygun ekipman kalibrasyonu ve bakımını yapın.

### Analitik Kalite Değerlendirmesi

#### QC 1: Saflaştırılmış, FFPE toplam RNA'sının kalite değerlendirmesi

Bu QC, DV200 metriğine dayalı olarak FFPE toplam RNA'nın kalitesini değerlendirir.

DV200, uzunluğu 200 nt ile 4000 nt arasında olan RNA fragmanlarının yüzdesi olarak ölçülür.

#### QC 2: Amplifiye edilmiş, adaptöre bağlı cDNA kütüphanelerinin kalite değerlendirmesi

Bu QC, adaptöre bağlı cDNA kütüphanesinin kalitesini (cDNA fragmanları doğru boyut aralığında, yani 150 ila 550 bp arasında olmalıdır) ve miktarını (ng/µl) değerlendirir.

#### QC 3: Amplifiye edilmiş, hedef açısından zenginleştirilmiş, indekslenmiş kütüphanenin kalite değerlendirmesi

---

<sup>1</sup> Histo-Clear, MammaPrint Blueprint NGS Kit ile kullanım için test edilmiştir.

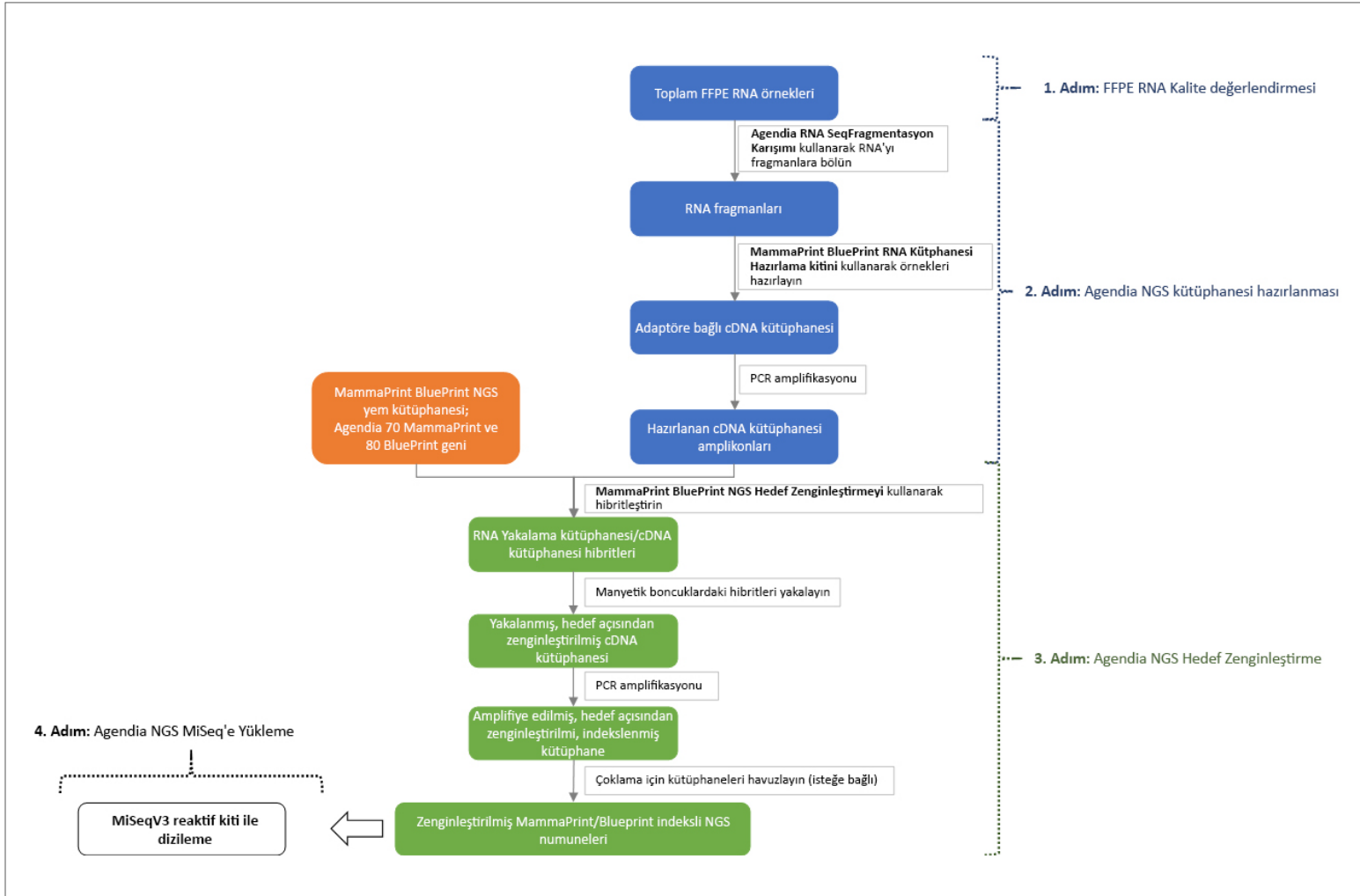
Bu QC, amplifiye edilmiş, hedef açısından zenginleştirilmiş indekslenmiş kütüphanenin kalitesini (cDNA fragmanları doğru boyut aralığında, yani 150 ila 700 bp arasında olmalıdır), miktarını (pg/μl) ve molaritesini (pmol/L) değerlendirir.

### Tayin Kontrolleri

İyi laboratuvar uygulaması, kullanıcının laboratuvarında sonuçlarda önemli değişkenlik veya yanlışlıklar üretebilecek teknik prosedür farklılıklarını tespit etmek için kontrol materyalinin değerlendirilmesini tavsiye eder.

Bu testin kullanıcının laboratuvarında ilk kullanımından önce, bilinen performans sonuçlarına sahip birkaç numunenin test edilmesiyle testin performansının doğrulanması önerilir.

### Test Prosedürü



Şekil 1: MammaPrint Blueprint NGS Kit prosedürüne genel bakış

## 1. Adım: FFPE RNA Kalite Değerlendirmesi ve Hazırlama

RNA izolasyonu, üreticinin kullanım talimatlarına uygun olarak QIAGEN RNeasy FFPE Kit kullanılarak gerçekleştirilir. İzole edilmiş FFPE toplam RNA, her iki oran için de 2,0'a yakın 260/280 ve 260/230 absorpsiyon oranı değerlerine sahip olmalıdır. 2,0'dan önemli sapma gösteren oranlar, daha fazla saflaştırma gerektirebilecek veya numunenin MammaPrint Blueprint NGS Kiti ile kullanım için uygun olmadığını gösterebilecek organik veya inorganik kirleticilerin varlığını gösterebilir.

Başlamadan önce, her numuneden nükleaz içermeyen su içinde toplam RNA hazırlayın.

| FFPE RNA Kalite Değerlendirmesi |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                 |                                                 |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1.1                             | Uygun bir nükleik asit fragman analiz platformu kullanarak FFPE RNA örnekleri için DV200 değerini değerlendirin. Standart, İyi ila Orta ve Kötü numuneler için numune başına 200 ng RNA alıkot alın. 200 ng mevcut değilse, aşağıdaki tabloda belirtilen RNA miktarını alıkot alın. |                                 |                                                 |
|                                 | Kategori                                                                                                                                                                                                                                                                            | Dağıtım Değeri (DV200)          | Kütüphane Hazırlanması için Gereklî RNA Miktarı |
|                                 | Standart                                                                                                                                                                                                                                                                            | 200 nt'nin üzerinde $\geq 70\%$ | 100 ng                                          |
|                                 | İyi ila Orta                                                                                                                                                                                                                                                                        | 200 nt'nin üzerinde $\geq 50\%$ | 150 ng                                          |
|                                 | Kötü                                                                                                                                                                                                                                                                                | 200 nt'nin üzerinde $\geq 20\%$ | 200 ng                                          |
|                                 | Tavsiye edilmez                                                                                                                                                                                                                                                                     | 200 nt'nin üzerinde $< 20\%$    | Tavsiye edilmez                                 |

## 2. Adım: Agendia NGS Kütüphanesi Hazırlanması

| RNA'nın Fragmanlara Bölünmesi ve Primer Tutunması |                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1                                               | <b>Agendia NGS Fragmanlara Bölme Karışımını</b> oda sıcaklığında çözündürün, ardından buz üzerine yerleştirin.                                                                                                                                                                |
| 2.2                                               | <b>Agendia NGS Birinci Zincir Ana Karışımını</b> buz üzerinde çözündürünüz.                                                                                                                                                                                                   |
| 2.3                                               | Örnek olarak alınan FFPE RNA'yı liyofilize etmek için bir vakum santrifüjü ( $\leq 45^\circ\text{C}$ ) kullanın. <u>Aşırı kurutmayın.</u>                                                                                                                                     |
| 2.4                                               | <b>Agendia NGS Fragmanlara Bölme Karışımını</b> 10 saniye vorteksle karıştırın. FFPE RNA'sını <b>19 µl Agendia NGS Fragmentation Karışımında</b> yeniden süspansiyon haline getirin. Vorteksleyin ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                            |
| 2.5                                               | Standart ve İyi/Orta RNA kalitesinde örnekler için aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:<br>95°C'de ısıtılmış kapak<br>1. 94°C'de 2 dakika<br>2. 65°C'de 3 dakika<br>3. 4°C'de en az 1 dakika<br>Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun. |
| 2.6                                               | Kötü RNA kalitesinde örnekler için aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:<br>95°C'de ısıtılmış kapak<br>1. 65°C'de 5 dakika<br>2. 4°C'de en az 1 dakika<br>Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun.                                        |

| Birinci Zincir cDNA'nın Sentezi                                                           |                                                                                                                                                                                                                              |                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 2.7                                                                                       | Aşağıdaki tabloya göre seyreltilmiş taze 120 ng/μl <b>Aktinomisin D</b> hazırlayın. Bu hacim 96 reaksiyon için yeterlidir.                                                                                                   |                               |
|                                                                                           | <b>Agendia NGS Nükleazsız Su</b>                                                                                                                                                                                             | 97 μl                         |
|                                                                                           | <b>Aktinomisin D (DMSO'da 4 μg/μl)</b>                                                                                                                                                                                       | 3 μl                          |
|                                                                                           | <b>Toplam hacim</b>                                                                                                                                                                                                          | 100 μl                        |
| Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre döndürün, oda sıcaklığında tutun ve ışıktan koruyun. |                                                                                                                                                                                                                              |                               |
| 2.8                                                                                       | <b>Agendia NGS Birinci Zincir Sentezi Karışımı</b> nı aşağıdaki tabloya göre hazırlayın. 1 ek reaksiyon daha var gibi hesaplayın.                                                                                            |                               |
|                                                                                           | <b>Not:</b> Birinci Zincir Ana Karışımını reaktif bileşenlerini birleştirmeden önce 10 saniye vorteksle karıştırın.                                                                                                          |                               |
|                                                                                           | <b>Reaktif</b>                                                                                                                                                                                                               | <b>Reaksiyon başına hacim</b> |
|                                                                                           | <b>Aktinomisin D (H<sub>2</sub>O içinde 120 ng/μl)</b>                                                                                                                                                                       | 0,5 μl                        |
|                                                                                           | <b>Agendia NGS Birinci Zincir Ana Karışımı</b>                                                                                                                                                                               | 8,0 μl                        |
|                                                                                           | <b>Toplam hacim</b>                                                                                                                                                                                                          | <b>8,5 μl</b>                 |
| Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre döndürün ve buzda tutun.                             |                                                                                                                                                                                                                              |                               |
| 2.9                                                                                       | Buz üzerinde, yeni bir Birinci Zincir cDNA plakasının her kuyucuğuna <b>8,5 μl Agendia NGS Birinci Zincir Sentezi Karışımı</b> ekleyin.                                                                                      |                               |
| 2.10                                                                                      | Fragmanlara ayrılmış FFPE RNA'yı Birinci Sarmal cDNA plakasının kuyucuklarına aktarın. Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                |                               |
| 2.11                                                                                      | Aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:<br>95°C'de ısıtılmış kapak<br>1. 25°C'de 10 dakika<br>2. 37°C'de 40 dakika<br>3. 4°C'de en az 3 dakika<br>Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun. |                               |

| İkinci Zincir cDNA Sentezi ve Uç Onarımı                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                               |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 2.12                                                          | <b>İkinci Zincir Sentezi ve Son Onarım Karışımı</b> nı aşağıdaki tabloya göre hazırlayın. 1 ek reaksiyon daha var gibi hesaplayın.                                                                                                                                                           |                               |
|                                                               | <b>Not:</b> Birleştirmeden önce her reaktifi 5 saniye boyunca vorteksleyin.                                                                                                                                                                                                                  |                               |
|                                                               | <b>Reaktif</b>                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>Reaksiyon başına hacim</b> |
|                                                               | <b>Agendia NGS İkinci Zincir + Uç Onarım Enzim Karışımı</b>                                                                                                                                                                                                                                  | 25,0 μl                       |
|                                                               | <b>Agendia NGS İkinci Zincir + Uç Onarım Oligo Karışımı</b>                                                                                                                                                                                                                                  | 5,0 μl                        |
|                                                               | <b>Toplam Hacim</b>                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>30,0 μl</b>                |
| Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre döndürün ve buzda tutun. |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                               |
| 2.13                                                          | Her kuyucuğa <b>30 μl İkinci Zincir Sentezi ve Son Onarım Karışımı</b> ekleyin.                                                                                                                                                                                                              |                               |
| 2.14                                                          | Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                       |                               |
| 2.15                                                          | Aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:<br>Isıtmalı kapak kullanmayın. Isıtmalı kapak devre dışı bırakılamıyorsa, program kapak açıkken çalıştırılmalıdır.<br>1. 16°C'de 60 dakika<br>2. 4°C'de en az 3 dakika<br>Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun. |                               |

| AMPure XP boncuklarını kullanarak sentezlenmiş cDNA'yı saflaştırın                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.16                                                                                                              | <b>AMPure XP boncuklarının</b> oda sıcaklığına en az 30 dakika dengelenmesine izin verin. Homojen olana kadar boncuk süspansiyonunu vorteksleyin.<br><b>cDNA 3' Uçlarının Adenilatlanması</b> ile devam ederseniz, <b>Agendia NGS da Kuyruk Ekleme Ana Karışımını</b> buz üzerinde çözündürünüz. |
| 2.17                                                                                                              | Yeni bir 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının her kuyucuğuna <b>108 µl</b> homojen boncuk süspansiyonu ekleyin.                                                                                                                                                                                   |
| 2.18                                                                                                              | <b>57,5 µl</b> numune karışımını 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.                                                                                                                                                                                                  |
| 2.19                                                                                                              | Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                           |
| 2.20                                                                                                              | Numuneleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                |
| 2.21                                                                                                              | Plakayı oda sıcaklığında en az 5 dakika manyetik stand üzerinde tutun.                                                                                                                                                                                                                           |
| 2.22                                                                                                              | Plaka manyetik stand üzerindeyken, berraklaşmış çözeltiyi her bir kuyucuktan dikkatlice uzaklaştırın ve atın. Çözeltiyi uzaklaştırırken boncuklara dokunmayın.                                                                                                                                   |
| 2.23                                                                                                              | Plaka manyetik stand üzerindeyken, her kuyucuğa <b>200 µl</b> taze %70 etanol koyun.                                                                                                                                                                                                             |
| 2.24                                                                                                              | Varsa dağılmış boncukların çökmesine izin vermek için 10 saniye (veya çözelti berrak olana kadar) bekleyin, ardından etanolü dikkatlice uzaklaştırın.                                                                                                                                            |
| 2.25                                                                                                              | Toplam 2 yıkama olacak şekilde tekrarlayın.                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 2.26                                                                                                              | Gerekirse, MIDI plakasını kısa bir süre santrifüj yapın, plakayı manyetik standı geri koyun ve ardından kalan etanol damlacıklarını bir pipetle uzaklaştırın.                                                                                                                                    |
| 2.27                                                                                                              | Numuneleri ısı bloku üzerinde 37°C'de 3 dakika kurutun. Aşırı kurutmayın, ancak tüm etanolün uzaklaştırıldığından emin olun.                                                                                                                                                                     |
| 2.28                                                                                                              | Her numune kuyucuğuna <b>21,5 µl</b> nükleaz içermeyen su ekleyin.                                                                                                                                                                                                                               |
| 2.29                                                                                                              | Plakayı kapatın, vorteksle iyice karıştırın ve sıvıyı toplamak için plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                        |
| 2.30                                                                                                              | Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 2.31                                                                                                              | MIDI plakasını manyetik stand üzerine yerleştirin ve 5 dakika veya çözelti berrak olana kadar inkübe edin.                                                                                                                                                                                       |
| 2.32                                                                                                              | <b>20 µl</b> berraklaşmış süpernatantı uzaklaştırın ve yeni bir 0,2 ml 96 kuyucuklu plakaya ekleyin.                                                                                                                                                                                             |
| <b>Durma noktası:</b> Bir sonraki adıma devam etmiyorsanız, plakayı kapatın ve -15°C ila -25°C arasında saklayın. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

| cDNA 3' Uçlarının Adenilatlanması |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                               |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 2.33                              | <b>Agendia NGS dA Kuyruk Ekleme Ana Karışımını</b> buz üzerinde çözündürünüz.<br><b>Agendia NGS dA Kuyruk Ekleme Ana Karışımı</b> yüksek hızda 15 saniye boyunca vorteksle karıştırın. <b>20 µl</b> berraklaşmış süpernatant içeren plakanın her kuyucuğuna <b>20 µl</b> ekleyin. Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre döndürün ve buzda tutun. |                               |
| 2.34                              | Aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:<br>Isıtmalı kapak kullanmayın. Isıtmalı kapak devre dışı bırakılamıyorsa, program kapak açıkken çalıştırılmalıdır.<br>1. 37°C'de 30 dakika<br>2. 4°C'de en az 3 dakika<br>Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun.                                                    |                               |
| Adaptörlerin Ligasyonu            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                               |
| 2.35                              | <b>Agendia NGS Ligasyon Ana Karışımını</b> buzda çözündürünüz.<br><b>Agendia NGS Oligo Adaptör Karışımını</b> buz üzerinde çözündürünüz.<br><b>Adaptör Ligasyon Karışımını</b> aşağıdaki tabloya göre hazırlayın. <b>Not:</b> Her reaktifi 10 saniye boyunca Karışımı vorteksleyin.                                                             |                               |
|                                   | <b>Reaktif</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>Reaksiyon başına hacim</b> |
|                                   | <b>Agendia NGS Ligasyon Ana Karışımı</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 5,0 µl                        |
|                                   | <b>Agendia NGS Oligo Adaptör Karışımı</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 5,0 µl                        |
|                                   | <b>Toplam hacim</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>10,0 µl</b>                |
|                                   | Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre döndürün ve buzda tutun.                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                               |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | Küçük numune grupları için, reaktif bileşenleri her numune kuyucuğuna ayrı ayrı eklenebilir. Tek tek eklerken, tüm hacmin dağıtılmasını sağlamak için Agendia NGS Ligation Ana Karışımını yavaşça pipetleyin.                                                                                |
| 2.36 | Adenilat/Ligasyon plakasını buza yerleştirin, ardından her numune kuyucuğuna <b>10 µl Adaptör Ligasyon Karışımı</b> ekleyin.<br>Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                       |
| 2.37 | Aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:<br>Isıtmalı kapak kullanmayın. Isıtmalı kapak devre dışı bırakılamıyorsa, program kapak açıkken çalıştırılmalıdır.<br>1. 20°C'de 15 dakika<br>2. 4°C'de en az 3 dakika<br>Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun. |

| AMPure XP Boncukları Kullanılarak Adaptöre Bağlı cDNA'nın Saflaştırılması |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.38                                                                      | <b>AMPure XP boncuklarının</b> oda sıcaklığına en az 30 dakika dengeye gelmesine izin verin. Homojen olana kadar boncuk süspansiyonunu vorteksleyin.<br><b>Agendia NGS PCR Ana Karışımını</b> oda sıcaklığında çözündürün. Çözündüğünde buza koyun.<br><b>Agendia NGS Urasil DNA Glikosilaz (UDG), Agendia NGS İleri PCR Primeri ve Agendia NGS Ters PCR Primerini buzda çözündürün.</b> |
| 2.39                                                                      | Yeni bir 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının her kuyucuğuna <b>90 µl</b> homojen boncuk süspansiyonu ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 2.40                                                                      | <b>50 µl</b> numune karışımını 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 2.41                                                                      | Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 2.42                                                                      | Numuneleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 2.43                                                                      | Plakayı oda sıcaklığında manyetik standı en az 5 dakika yerleştirin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 2.44                                                                      | Plaka manyetik stand üzerindeyken, berraklaşmış çözeltiyi her bir kuyucuktan dikkatlice uzaklaştırın ve atın. Çözeltiyi uzaklaştırırken boncuklara dokunmayın.                                                                                                                                                                                                                           |
| 2.45                                                                      | Plaka manyetik stand üzerindeyken, her bir kuyucuğa <b>200 µl</b> taze %70 etanol ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 2.46                                                                      | Varsa dağılmış boncukların çökmesine izin vermek için 10 saniye (veya çözelti berrak olana kadar) bekleyin, ardından etanolü dikkatlice uzaklaştırın.                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2.47                                                                      | Toplam 2 yıkama olacak şekilde tekrarlayın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 2.48                                                                      | Gerekirse, MIDI plakasını kısa bir süre santrifüj yapın, plakayı manyetik standı geri koyun ve ardından kalan etanol damlacıklarını bir pipetle uzaklaştırın.                                                                                                                                                                                                                            |
| 2.49                                                                      | Numuneleri ısı bloku üzerinde 37°C'de 3 dakika kurutun. Aşırı kurutmayın, ancak tüm etanolün uzaklaştırıldığından emin olun.                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 2.50                                                                      | Her numune kuyucuğuna <b>23 µl</b> nükleaz içermeyen su ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 2.51                                                                      | Plakayı kapatın, vorteksle iyice karıştırın ve sıvıyı toplamak için plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 2.52                                                                      | Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 2.53                                                                      | MIDI plakasını manyetik stand üzerine yerleştirin ve 5 dakika veya çözelti berrak olana kadar inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 2.54                                                                      | <b>22 µl</b> berraklaşmış süpernatantı uzaklaştırın ve yeni bir 0,2 ml 96 kuyucuklu plakaya ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

| Adaptöre Bağlı cDNA Kütüphanesinin Amplifikasyonu |                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.55                                              | Aşağıdaki tabloya göre buz üzerinde <b>Yakalama Öncesi PCR Karışımı</b> hazırlayın.<br><b>Not:</b> Birleştirmeden önce 30 saniye boyunca <b>Agendia NGS PCR Ana Karışımı</b> reaktifini vorteksleyin. |
|                                                   | <b>Reaktif</b>                                                                                                                                                                                        |
|                                                   | <b>Reaksiyon başına hacim</b>                                                                                                                                                                         |
|                                                   | <b>Agendia NGS PCR Ana Karışımı</b> 25,0 µl                                                                                                                                                           |
|                                                   | <b>Agendia NGS Urasil DNA Glikosilaz (UDG)</b> 1,0 µl                                                                                                                                                 |
|                                                   | <b>Agendia NGS İleri Yönlü PCR Primeri</b> 1,0 µl                                                                                                                                                     |
|                                                   | <b>Agendia NGS Ters Yönlü PCR Primeri</b> 1,0 µl                                                                                                                                                      |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <i>Toplam hacim</i> <b>28,0 µl</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|      | Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre döndürün ve buzda tutun.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 2.56 | Her numune kuyucuğuna <b>28 µl Yakalama Öncesi PCR Karışımı</b> ekleyin. Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 2.57 | Aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın: <ol style="list-style-type: none"> <li>95°C'de ısıtılmış kapak</li> <li>1. 37°C'de 15 dakika</li> <li>2. 95°C'de 2 dakika</li> <li>3. 95°C'de 30 saniye</li> <li>4. 65°C'de 30 saniye</li> <li>5. 72°C'de 1 dakika</li> <li>6. Toplam 14 döngü olacak şekilde 3.-5. adımları tekrarlayın</li> <li>7. 72°C'de 5 dakika</li> <li>8. 4°C'de en az 3 dakika</li> </ol> Devam etmeye hazır oluncaya kadar 4°C'de veya buz üzerinde tutun. |

|                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AMPure XP Boncukları Kullanılarak Adaptöre Bağlı cDNA'nın Saflaştırılması</b>                                  |                                                                                                                                                                                                                                          |
| 2.58                                                                                                              | <b>AMPure XP boncuklarının</b> oda sıcaklığına en az 30 dakika dengeye gelmesine izin verin. Homojen olana kadar boncuk süspansiyonunu vorteksleyin.                                                                                     |
| 2.59                                                                                                              | Yeni bir 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının her kuyucuğuna <b>90 µl</b> homojen boncuk süspansiyonu ekleyin.                                                                                                                            |
| 2.60                                                                                                              | <b>50 µl</b> numune karışımını 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.                                                                                                                                            |
| 2.61                                                                                                              | Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                   |
| 2.62                                                                                                              | Numuneleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                        |
| 2.63                                                                                                              | Plakayı en az 5 dakika oda sıcaklığında manyetik standda tutun.                                                                                                                                                                          |
| 2.64                                                                                                              | Plaka manyetik stand üzerindeyken, berraklaşmış çözeltiyi her bir kuyucuktan dikkatlice uzaklaştırın ve atın. Çözeltiyi uzaklaştırırken boncuklara dokunmayın.                                                                           |
| 2.65                                                                                                              | Plaka manyetik stand üzerindeyken, her bir kuyucuğa <b>200 µl</b> taze %70 etanol ekleyin.                                                                                                                                               |
| 2.66                                                                                                              | Varsa dağılmış boncukların çökmesine izin vermek için 10 saniye (veya çözelti berrak olana kadar) bekleyin, ardından etanolü dikkatlice uzaklaştırın.                                                                                    |
| 2.67                                                                                                              | Toplam 2 yıkama olacak şekilde tekrarlayın.                                                                                                                                                                                              |
| 2.68                                                                                                              | Gerekirse, MIDI plakasını kısa bir süre santrifüj yapın, plakayı manyetik standda geri koyun ve ardından kalan etanol damlacıklarını bir pipetle uzaklaştırın.                                                                           |
| 2.69                                                                                                              | Numuneleri ısı bloku üzerinde 37°C'de 3 dakika kurutun. Aşırı kurutmayın, ancak tüm etanolün uzaklaştırıldığından emin olun.                                                                                                             |
| 2.70                                                                                                              | Her numune kuyucuğuna <b>26 µl</b> nükleaz içermeyen su ekleyin.                                                                                                                                                                         |
| 2.71                                                                                                              | Plakayı kapatın, vorteksle iyice karıştırın ve sıvıyı toplamak için plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                |
| 2.72                                                                                                              | Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                   |
| 2.73                                                                                                              | MIDI plakasını manyetik stand üzerine yerleştirin ve 5 dakika veya çözelti berrak olana kadar inkübe edin.                                                                                                                               |
| 2.74                                                                                                              | <b>25 µl</b> berraklaşmış süpernatantı uzaklaştırın ve yeni bir 0,2 ml 96 kuyucuklu plakaya ekleyin.                                                                                                                                     |
| <b>Durma noktası:</b> Bir sonraki adıma devam etmiyorsanız, plakayı kapatın ve -15°C ila -25°C arasında saklayın. |                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Amplifiye, Adaptöre Bağlı cDNA'nın Miktarının Belirlenmesi ve Normalleştirilmesi</b>                           |                                                                                                                                                                                                                                          |
| 2.75                                                                                                              | 150 bp-550 bp arasındaki bölgede uygun bir nükleik asit fragmanı analiz platformu kullanarak Amplifiye, Adaptöre Bağlı, Yakalama Öncesi kütüphanesinin miktarını ölçün.<br>Toplam 200 ng cDNA yakalama öncesi kütüphanesini alikotlayın. |
| 2.76                                                                                                              | Bir vakum santrifüjü kullanarak, 200 ng cDNA yakalama öncesi kütüphanesini liyofilize edin ve <b>3,4 µl</b> nükleaz içermeyen suda tekrar çözün. <u>Aşırı kurutmayın</u> . Vorteksle iyice karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.   |
| <b>Durma noktası:</b> Bir sonraki adıma devam etmiyorsanız, plakayı kapatın ve -15°C ila -25°C arasında saklayın. |                                                                                                                                                                                                                                          |



### 3. Adım: Agendia NGS Hedef Zenginleştirme

Kütüphanenin Hibridize Edilmesi

3.1

Bir buz kovası hazırlayın ve reaktifleri aşağıda açıklandığı gibi çözündürün:

| A Karışımı Hyb (Hibritleme) Tamponu       | B Karışımı Hazırlanmış Kütüphane                | C Karışımı Yakalama Kütüphanesi                                            |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Agendia NGS Hyb No. 1<br>Oda sıcaklığında | Agendia NGS İndeksleme Bloku No. 1<br>4°C (buz) | Agendia NGS RNaz Bloku<br>Sadece C Karışımını yaparken<br>-20°C'den ayırın |
| Agendia NGS Hyb No. 2<br>Oda sıcaklığında | Agendia NGS Bloku No. 2<br>4°C (buz)            | MammaPrint Blueprint NGS Yemleri<br>Kütüphanesi<br>4°C (buz)               |
| Agendia NGS Hyb No. 3<br>Oda sıcaklığında | Agendia NGS İndeksleme Bloku No. 3<br>4°C (buz) | -                                                                          |
| Agendia NGS Hyb No. 4<br>Oda sıcaklığında | -                                               | -                                                                          |

3.2

Kütüphane A Karışımını aşağıdaki tabloya göre, oda sıcaklığında 1,5 ml'lik bir tüp içine hazırlayın.

| Reaktif               | Reaksiyon başına hacim |
|-----------------------|------------------------|
| Agendia NGS Hyb No. 1 | 6,63 µl                |
| Agendia NGS Hyb No. 2 | 0,27 µl                |
| Agendia NGS Hyb No. 3 | 2,65 µl                |
| Agendia NGS Hyb No. 4 | 3,45 µl                |
| Toplam hacim          | 13,0 µl                |

Karışımı yavaşça vorteksleyin, kısa bir süre döndürün ve oda sıcaklığında tutun.

3.3

Yeni bir 8'li şerit tüp hazırlayın ve “A” olarak etiketleyin, ardından her kuyucuğa Kütüphane A Karışımı örneği başına 13 µl örnek alın.  
Şerit tüpleri oda sıcaklığında tutun.

3.4

Kütüphane B Karışımını aşağıdaki tabloya göre buz üzerinde 0,5 ml'lik bir tüp içine hazırlayın.

| Reaktif                            | Reaksiyon başına hacim |
|------------------------------------|------------------------|
| Agendia NGS İndeksleme Bloku No. 1 | 2,5 µl                 |
| Agendia NGS Bloku No. 2            | 2,5 µl                 |
| Agendia NGS İndeksleme Bloku No. 3 | 0,6 µl                 |
| Toplam hacim                       | 5,6 µl                 |

Karıştırın, kısa bir süre döndürün ve buzda tutun.

3.5

Yeni bir 8'li şerit tüp hazırlayın ve “B” olarak etiketleyin, ardından

- Her kuyucuğa 5,6 µl Kütüphane B Karışımı ekleyin.
- Her ilgili kuyucuğa 3,4 µl numune ekleyin.
- Yavaşça 10 kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.

3.6

Kütüphane B Karışımını içeren 8'li şerit tüpü ve numuneyi bir ısı döngüleyiciye yerleştirin ve aşağıdaki programı çalıştırın:  
**105°C'de ısıtılmış kapak;** uygulanabiliyorsa hacim 29 µl olarak ayarlanmış

- 95°C'de 5 dakika
- 65°C'de 5 dakika
- 65°C'de tutun

3.7

Kütüphane C Karışımını aşağıdaki tabloya göre 4°C buz içerisinde 0,5 ml'lik tüpün içine hazırlayın.

| Reaktif                                         | Reaksiyon başına hacim |
|-------------------------------------------------|------------------------|
| Agendia NGS Nükleazsız Su                       | 4,5 µl                 |
| Agendia NGS RNaz Bloku                          | 0,5 µl                 |
| MammaPrint Blueprint NGS Yemleri<br>Kütüphanesi | 2,0 µl                 |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |               |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|      | Toplam hacim                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>7,0 µl</b> |
|      | Yukarı ve aşağı pipetleyerek yavaşça karıştırın. Kabarcık olmadığından emin olun.<br><b>Not:</b> C Karışımını adım 3.6'daki 65°C'de 5 dakikalık işaretine yakın zamanda hazırlayın. A Karışımını C Karışımına ekleyene kadar karışımı sadece kısa bir süre oda sıcaklığında tutun.<br>MammaPrint BluePrint NGS Yem Kütüphanelerini içeren çözeltileri uzun süre oda sıcaklığında saklamayın. |               |
| 3.8  | Yeni bir 8'li şerit tüpü " <b>C</b> " olarak etiketleyin ve 8'li şerit tüpünher kuyucuğuna <b>7 µl Kütüphane C Karışımı</b> ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                         |               |
| 3.9  | <b>13 µl Kütüphane A Karışımını, Kütüphane C Karışımı</b> olan 8'li şerit tüplere pipetleyin. 5 saniye vorteksle iyice karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin. 3.10 adımımda kullanılabilece kadar karışımı kısa bir süre oda sıcaklığında tutun.                                                                                                                                        |               |
| 3.10 | Isıl döngüleyici hala 65°C'de tutulurken tüm <b>Kütüphane A+C Karışımını Kütüphane B Karışımı</b> içeren numune kuyucuklarına pipetleyin. Tüm <b>Kütüphane A+C Karışımı</b> içeriğinin <b>Kütüphane B Karışımı</b> içine aktarıldığından emin olun.                                                                                                                                          |               |
| 3.11 | 10 kez yukarı ve aşağı pipetleyerek yavaşça karıştırın ve kapağı kapatın. Kabarcıklar varsa, hızlı bir döndürme yapın.                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |
| 3.12 | Tüm tüp kapaklarının kapalı olduğundan emin olun. Isı döngüleyicinin kapağını kapatın ve sonraki programı çalıştırın:<br>1. 65°C'de 17-24 saat<br>2. 65°C'de tutun                                                                                                                                                                                                                           |               |

| Streptavidin Boncukların Hazırlanması |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 3.13                                  | <b>Agendia NGS Yıkama Tamponu 2'</b> yi vorteksle karıştırın ve numune başına <b>650 µl</b> 'sini 2 ml'lik tüplere alikot alın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
| 3.14                                  | Alikot tüplerini en az 30 dakika boyunca 65°C'lik bir ısı blokuna koyun.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |
| 3.15                                  | Boncuk kümelerini ayırmak için <b>Dynabeads MyOne Streptavidin T1 boncuklarını</b> en az 30 saniye boyunca vorteksleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |
| 3.16                                  | Numune başına <b>50 µl</b> boncuğu 2 ml tüplere alın. (Tüp başına 4 numune için maksimum <b>200 µl</b> boncuk)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
| 3.17                                  | Streptavidin boncukların yıkanması:<br>a. 2 ml tüpe <b>ÖRNEK BAŞINA 200 µl Agendia NGS Bağlama Tamponu</b> ekleyin. (Tüp başına 4 numune için maksimum <b>800 µl</b> tampon)<br>b. Boncukları bir vorteksle 5 saniye karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.<br>c. 2,0 ml tüpleri 2 dakika boyunca manyetik bir ayırıcı cihaza koyun ve çözeltinin berraklaşmasına izin verin.<br>d. Süpernatantı uzaklaştırın ve atın.<br>e. Toplam 3 yıkama olacak şekilde a. ile d. arasındaki adımları tekrarlayın. |  |
| 3.18                                  | Boncukları <b>Agendia NGS Bağlama Tamponu</b> örneği başına <b>200 µl</b> olacak şekilde yeniden süspansiyon haline getirin ve bunları 8'li şerit PCR tüplerine alın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |

| Streptavidin Boncukları Kullanılarak Hibritlerin Yakalanması |                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 3.19                                                         | Numuneleri ısı döngüleyici üzerinde 65°C'de tutarken, <b>17-24 saat inkübe edilmiş Hibridizasyon Kütüphanesinden 29 µl'yi 200 µl</b> yıkanmış streptavidin boncukları içeren 8'li şerit tüpe aktarın.<br>(Yıkanmış Streptavidin boncuklarını oda sıcaklığında saklayın). |  |
| 3.20                                                         | 8'li şerit tüpü kapatın ve ters çevirerek karıştırın ve ardından hızlı döndürün.                                                                                                                                                                                         |  |
| 3.21                                                         | Numuneyi ısı karıştırıcı üzerinde 1400 rpm'de 27°C'de 30 dakika inkübe edin.<br><b>Not:</b> 5 dakika sonra boncukların topaklanıp topaklanmadığını kontrol edin. Boncuk kümeleri oluşmuşsa, tüpü hızlı vorteksleyin.                                                     |  |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | 30 dakikalık inkübasyondan sonra ısı karıştırıcıyı 65°C'ye ayarlayın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 3.22 | Kısa bir süre tüpleri santrifüj yapın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 3.23 | Boncukları süspansiyondan toplamak için plakayı 2 dakika boyunca manyetik bir ayırıcıya koyun.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 3.24 | Süpernatantı uzaklaştırın ve atın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3.25 | Boncukları bir vorteksle 5 saniye karıştırarak <b>200 µl Agendia NGS Yıkama Tamponu 1</b> içinde yeniden süspansiyon haline getirin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 3.26 | Numuneleri oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3.27 | Boncukları ve tamponu manyetik bir ayırıcı üzerinde 2 dakika ayırın ve süpernatantı uzaklaştırın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 3.28 | <p>Boncukları <b>Agendia NGS Yıkama Tamponu 2</b> ile yıkayın:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Boncukları <b>200 µl</b> önceden ısıtılmış 65°C Agendia NGS Yıkama Tamponu 2 içinde yeniden süspansiyon haline getirin.</li> <li>Tüplerin kapaklarını kapatın ve boncukları tekrar süspansiyon haline getirmek için 5 saniye boyunca bir vorteks karıştırıcıyla karıştırın. Kısa bir süre döndürün.</li> <li>Tüpleri bir ısı çalkalayıcı üzerinde 65°C'de ve 1200 rpm'de 10 dakika inkübe edin.</li> <li>Boncukların çökelmediğini fark ederseniz ara sıra karıştırmak için tüpleri ters çevirin.</li> <li>Tüpleri bir santrifüj veya mini plaka çevirici içinde kısa bir süre döndürün.</li> <li>Tüpleri 2 dakika boyunca manyetik bir ayırıcıya koyun.</li> <li>Süpernatantı uzaklaştırın ve atın.</li> <li>Toplam 3 yıkama olacak şekilde a'dan g'ye kadar olan adımları tekrarlayın.</li> </ol> |
| 3.29 | Boncukları yeniden süspansiyon haline getirmek için boncukları <b>31,5 µl Agendia NGS Elüsyon Tamponunda 5 saniye vorteksleyin</b> . Kısa bir süre döndürün.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 3.30 | Numuneleri oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3.31 | Manyetik ayırıcı üzerindeki boncukları ve tamponu 2 dakika ayırın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3.32 | <b>30 µl</b> süpernatantı taze bir plakaya aktarın. Boncukları atın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 3.33 | Yakalanan cDNA kütüphanesine <b>30 µl Agendia NGS Nötralizasyon Tamponu</b> ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

| Yakalanan Kütüphaneyi AMPure XP boncuklarıyla saflaştırın |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.34                                                      | <p><b>AMPure XP boncuklarının</b> en az 30 dakika oda sıcaklığına dengelenmesine izin verin. Homojen olana kadar boncuk süspansiyonunu vorteksleyin.</p> <p><b>"İndeks Etiketlerini Ekleme İçin Yakalanan Kütüphanelerin Amplifiye Edilmesi"</b> adımıyla devam ediyorsanız, <b>Agendia NGS PCR Karışımı</b>, <b>Agendia NGS Yakalama Sonrası PCR Primeri</b> ve <b>Agendia NGS 8 bp Index Plakasını</b> çözündürün ve bunları buza yerleştirin.</p> |
| 3.35                                                      | Yeni bir 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının her kuyucuğuna <b>108 µl</b> homojen boncuk süspansiyonu ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 3.36                                                      | Adım 3.33'teki numune karışımından <b>60 µl</b> ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 3.37                                                      | Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 3.38                                                      | Numuneleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 3.39                                                      | Plakayı en az 5 dakika oda sıcaklığında manyetik standda tutun.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 3.40                                                      | Plaka manyetik stand üzerindeyken, berraklaşmış çözeltiyi her bir kuyucuktan dikkatlice uzaklaştırın ve atın. Çözeltiyi uzaklaştırırken boncuklara dokunmayın.                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|                                                                                                                   |                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.41                                                                                                              | Plaka manyetik stand üzerindeyken, her bir kuyucuğa <b>200 µl</b> taze %70 etanol ekleyin.                                                                    |
| 3.42                                                                                                              | Varsa dağılmış boncukların çökmesine izin vermek için 10 saniye (veya çözelti berrak olana kadar) bekleyin, ardından etanolü dikkatlice uzaklaştırın.         |
| 3.43                                                                                                              | Toplam 2 yıkama olacak şekilde tekrarlayın.                                                                                                                   |
| 3.44                                                                                                              | Gerekirse, MIDI plakasını kısa bir süre santrifüj yapın, plakayı manyetik standı geri koyun ve ardından kalan etanol damlacıklarını bir pipetle uzaklaştırın. |
| 3.45                                                                                                              | Numuneleri ısı bloku üzerinde 37°C'de 3 dakika kurutun. Aşırı kurutmayın, ancak tüm etanolün uzaklaştırıldığından emin olun.                                  |
| 3.46                                                                                                              | Her numune kuyucuğuna <b>36 µl</b> nükleaz içermeyen su ekleyin.                                                                                              |
| 3.47                                                                                                              | Plakayı kapatın, vorteksle iyice karıştırın ve sıvıyı toplamak için plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.                                                     |
| 3.48                                                                                                              | Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.                                                                                                                        |
| 3.49                                                                                                              | MIDI plakasını manyetik stand üzerine yerleştirin ve 5 dakika veya çözelti berrak olana kadar inkübe edin.                                                    |
| 3.50                                                                                                              | <b>35 µl</b> berraklaşmış süpernatantı uzaklaştırın ve yeni bir 0,2 ml 96 kuyucuklu plakaya ekleyin.                                                          |
| <b>Durma noktası:</b> Bir sonraki adıma devam etmiyorsanız, plakayı kapatın ve -15°C ila -25°C arasında saklayın. |                                                                                                                                                               |

| İndeks Etiketlerini Ekleme İçin Yakalanmış Kütüphanelerin Amplifiye Edilmesi |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------------------|------|--------------|--------------|
| 3.51                                                                         | <p><b>Agendia NGS PCR Karışımını, Agendia NGS Yakalama Sonrası PCR Primeri ve Agendia NGS 8 bp İndeks Plakasını</b> çözündürün ve bunları buza yerleştirin.<br/> <b>Not:</b> <b>Agendia NGS PCR Ana Karışımı</b> viskozdur, PCR primerlerini eklemekten önce <b>30 saniye boyunca</b> vorteksle karıştırın.</p> <p><b>Yakalama Sonrası PCR Karışımına</b> aşağıdaki tabloya göre buz içindeki 1,5 ml'lik bir tüpe hazırlayın.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reaktifler</th><th>Reaksiyon başına hacim</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Agendia NGS PCR Ana Karışımı</b></td><td>25 µl</td></tr> <tr> <td><b>Agendia NGS Yakalama Sonrası PCR Primeri</b></td><td>1 µl</td></tr> <tr> <td>Toplam Hacim</td><td><b>26 µl</b></td></tr> </tbody> </table> <p>Karışımı yavaşça vorteksle karıştırın ve döndürün. Buz üzerinde tutun.</p> | Reaktifler | Reaksiyon başına hacim | <b>Agendia NGS PCR Ana Karışımı</b> | 25 µl | <b>Agendia NGS Yakalama Sonrası PCR Primeri</b> | 1 µl | Toplam Hacim | <b>26 µl</b> |
| Reaktifler                                                                   | Reaksiyon başına hacim                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| <b>Agendia NGS PCR Ana Karışımı</b>                                          | 25 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| <b>Agendia NGS Yakalama Sonrası PCR Primeri</b>                              | 1 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| Toplam Hacim                                                                 | <b>26 µl</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| 3.52                                                                         | Her numunenin amplifiye edilmesi için, <b>Yakalama Sonrası PCR Karışımının 26 µl'sini</b> bir PCR plakası kuyucuğuna yerleştirin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| 3.53                                                                         | Yakalama Sonrası PCR Karışımını içeren her kuyucuğa 5 µl uygun <b>indeksleme primeri (Agendia NGS 8 bp İndeks Plakasından)</b> ekleyin.<br><b>Aynı şeritte dizilemesi yapılacak her numune için farklı bir indeksleme primeri kullanın.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| 3.54                                                                         | <b>Yakalama Sonrası PCR Karışımını</b> içeren her kuyucuğa 3.50 adımıdaki saflaştırılmış kütüphaneden <b>19 µl</b> ekleyin. Yukarı ve aşağı yönde 10 kez pipetleyerek karıştırın. Plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |
| 3.55                                                                         | <p>PCR plakasını bir ısı döngüleyiciye yerleştirin. Aşağıdaki ısı döngüleyici programını çalıştırın:</p> <p><b>105°C'de Isıtmalı Kapak</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>95°C'de 2 dakika</li> <li>95°C'de 30 saniye</li> <li>57°C'de 30 saniye</li> <li>72°C'de 1 dakika</li> <li>Toplam 12 döngü olacak şekilde 2.-4. adımları tekrarlayın</li> <li>72°C'de 5 dakika</li> <li>4°C'de tutun</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                        |                                     |       |                                                 |      |              |              |

| AMPure XP Boncuklarını Kullanarak Amplifiye, Yakalanmış Kütüphanelerin Safaştırılması.                                                                        |                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.56                                                                                                                                                          | <b>AMPure XP boncuklarının</b> en az 30 dakika oda sıcaklığına dengelenmesine izin verin. Homojen olana kadar boncuk süspansiyonunu vorteksleyin.              |
| 3.57                                                                                                                                                          | Yeni bir 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının her kuyucuğuna <b>90 µl</b> homojen boncuk süspansiyonu ekleyin.                                                  |
| 3.58                                                                                                                                                          | <b>50 µl</b> numune karışımını 0,8 ml 96 kuyucuklu MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.                                                                  |
| 3.59                                                                                                                                                          | Plakayı kapatın, vorteksle karıştırın ve kısa bir süre santrifüjleyin.                                                                                         |
| 3.60                                                                                                                                                          | Numuneleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.                                                                                                              |
| 3.61                                                                                                                                                          | Plakayı en az 5 dakika oda sıcaklığında manyetik standda tutun.                                                                                                |
| 3.62                                                                                                                                                          | Plaka manyetik stand üzerindeyken, berraklaşmış çözeltiyi her bir kuyucuktan dikkatlice uzaklaştırın ve atın. Çözeltiyi uzaklaştırırken boncuklara dokunmayın. |
| 3.63                                                                                                                                                          | Plaka manyetik stand üzerindeyken, her bir kuyucuğa <b>200 µl</b> taze %70 etanol ekleyin.                                                                     |
| 3.64                                                                                                                                                          | Varsa dağılmış boncukların çökmesine izin vermek için 10 saniye (veya çözelti berrak olana kadar) bekleyin, ardından etanolü dikkatlice uzaklaştırın.          |
| 3.65                                                                                                                                                          | Toplam 2 yıkama olacak şekilde tekrarlayın.                                                                                                                    |
| 3.66                                                                                                                                                          | Gerekirse, MIDI plakasını kısa bir süre santrifüj yapın, plakayı manyetik standda geri koyun ve ardından kalan etanol damlacıklarını bir pipetle uzaklaştırın. |
| 3.67                                                                                                                                                          | Numuneleri ısı bloku üzerinde 37°C'de 3 dakika kurutun. Aşırı kurutmayın, ancak tüm etanolün uzaklaştırıldığından emin olun.                                   |
| 3.68                                                                                                                                                          | Her numune kuyucuğuna <b>22,5 µl Tampon EB</b> ekleyin.                                                                                                        |
| 3.69                                                                                                                                                          | Plakayı kapatın, vorteksle iyice karıştırın ve sıvıyı toplamak için plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.                                                      |
| 3.70                                                                                                                                                          | Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.                                                                                                                         |
| 3.71                                                                                                                                                          | MIDI plakasını manyetik stand üzerine yerleştirin ve 5 dakika veya çözelti berrak olana kadar inkübe edin.                                                     |
| 3.72                                                                                                                                                          | Berraklaşmış süpernatanttan <b>21 µl</b> 'yi yeni bir 96 kuyucuklu plakaya veya yeni tüplere alın.                                                             |
| <b>Durma noktası:</b> Bir sonraki adıma devam etmiyorsanız, plakayı kapatın ve <b>21 µl'lik indekslenmiş</b> kütüphaneleri -15°C ila -25°C arasında saklayın. |                                                                                                                                                                |

### QC 3: Amplifiye edilmiş, hedef açısından zenginleştirilmiş, indekslenmiş kütüphanenin kalite değerlendirmesi

Uygun bir nükleik asit fragman analiz platformu kullanarak amplifiye edilmiş, yakalanmış, indekslenmiş kütüphanenin boyut dağılımını onaylayın. Fragman boyutu dağılımı 150-700 bp olmalıdır. Doğru miktar tayini için, konsantrasyonun testin doğrusal aralığına (5-500 pg/µl) düştüğünden emin olun.

| Stok Molaritesi [pmol/L] | Molarite Hedefi [nM]           |
|--------------------------|--------------------------------|
| ≥ 4000                   | 4                              |
| 2000-3999                | 2                              |
| 1000-1999                | 1                              |
| <1000                    | Çalıştırmayın, örnek başarısız |

## 4. Adım: Agendia NGS MiSeq'e Yükleme

| Örnek Sayfasının Hazırlanması                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------|---------------|--------------------------------|--------------|-----------------|----------------------------------------|-----------|----------------------------------------|-----------|----------------------------------------|-------|---------|----------|--------------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------------------|---|--------------------|---|----------|-----------|---------------|----------------|---------------|--------|-------------|----------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| 4.1                                                          | <p>MiSeq Örnek Sayfasını aşağıdaki talimatlara göre virgülle ayrılmış değer (CSV) biçiminde hazırlayın.<br/>Bu 150 bp'lik, tek uçlu bir protokoldür.<br/>Genel talimatlar için lütfen Illumina'nın referans kılavuzuna bakın:<br/><a href="https://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html">https://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html</a><br/>Bir MiSeq Örnek Sayfası örneği burada bulunabilir: <a href="https://diagnostic-products.agendia.com/resources/">https://diagnostic-products.agendia.com/resources/</a></p> <p><b>(Başlık)</b> altında</p> <table><tr><td>Araştırmacı Adı</td><td>Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır</td></tr><tr><td>Proje Adı</td><td>Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır</td></tr><tr><td>Deney Adı</td><td>Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır</td></tr><tr><td>Tarih</td><td>Gerekli</td></tr><tr><td>İş Akışı</td><td>Gerekli <b>[GenerateFastQ]</b></td></tr><tr><td>Tayin</td><td>Gerekli <b>[SureSelect]</b></td></tr><tr><td>Kimya</td><td>Gerekli <b>(Varsayılan)</b></td></tr></table> <p><b>(Okumalar):</b> Altında <b>150</b></p> <p><b>(Ayarlar)</b> altında</p> <table><tr><td>OnlyGenerateFASTQ</td><td>1</td></tr><tr><td>FiltrePCRuplicates</td><td>0</td></tr></table> <p><b>[Data] (Veri):</b> altında</p> <table><tr><th>Örnek No</th><th>Örnek Adı</th><th>Örnek Plakası</th><th>Örnek Kuyucuğu</th><th>Örnek Projesi</th><th>İndeks</th><th>I7_Index_ID</th></tr><tr><td>Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır</td><td>İsteğe Bağlı</td><td>İsteğe Bağlı</td><td>İsteğe Bağlı</td><td>İsteğe Bağlı</td><td>Gerekli <b>(İndeks Dizisi)</b></td><td>İsteğe Bağlı</td></tr></table> <p><b>Not: Her örneğe ait benzersiz bir "Örnek No" olmalıdır; "Örnek Adı" FASTQ dosya adlarında yer alacaktır</b><br/>Save sheet (Sayfayı kaydet). Yazılım, kullanıcıdan Örnek Sayfasını yüklemesini isteyecektir.</p> |               |                |               |                                |              | Araştırmacı Adı | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır | Proje Adı | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır | Deney Adı | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır | Tarih | Gerekli | İş Akışı | Gerekli <b>[GenerateFastQ]</b> | Tayin | Gerekli <b>[SureSelect]</b> | Kimya | Gerekli <b>(Varsayılan)</b> | OnlyGenerateFASTQ | 1 | FiltrePCRuplicates | 0 | Örnek No | Örnek Adı | Örnek Plakası | Örnek Kuyucuğu | Örnek Projesi | İndeks | I7_Index_ID | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır | İsteğe Bağlı | İsteğe Bağlı | İsteğe Bağlı | İsteğe Bağlı | Gerekli <b>(İndeks Dizisi)</b> | İsteğe Bağlı |
| Araştırmacı Adı                                              | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Proje Adı                                                    | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Deney Adı                                                    | Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Tarih                                                        | Gerekli                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| İş Akışı                                                     | Gerekli <b>[GenerateFastQ]</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Tayin                                                        | Gerekli <b>[SureSelect]</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Kimya                                                        | Gerekli <b>(Varsayılan)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| OnlyGenerateFASTQ                                            | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| FiltrePCRuplicates                                           | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Örnek No                                                     | Örnek Adı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Örnek Plakası | Örnek Kuyucuğu | Örnek Projesi | İndeks                         | I7_Index_ID  |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| Gerekli, kullanıcı tarafından sağlanır                       | İsteğe Bağlı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | İsteğe Bağlı  | İsteğe Bağlı   | İsteğe Bağlı  | Gerekli <b>(İndeks Dizisi)</b> | İsteğe Bağlı |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| 4.2                                                          | Illumina'nın tavsiyelerine göre reaktif kartuşunu hazırlayın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| <b>Çoklu Dizileme İçin Nihai Kütüphanelerin Havuzlanması</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| 4.3                                                          | Kullanılan dizileme protokolü ( <b>1 nM, 2 nM veya 4 nM</b> ) hazırlanan Örnek Sayfasındaki numunelere dayalıdır. Her numuneyi ayrı ayrı Molarite Hedefine (yani 1 nM, 2 nM veya 4 nM) seyreltin. Farklı molarite hedeflerine sahip numunelerin tek bir MiSeq çalışmasında birleştirilmesi gerekiyorsa, tüm numuneleri en düşük ortak molarite hedefine seyreltin ve ardından havuzlayın.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| 4.4                                                          | Tek bir 1,5 ml tüpe her normalleştirilmiş numuneden <b>5 µl</b> ekleyin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |
| 4.5                                                          | Karışımı vorteksleyin, kısa bir süre santrifüjleyin ve buza koyun.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |               |                |               |                                |              |                 |                                        |           |                                        |           |                                        |       |         |          |                                |       |                             |       |                             |                   |   |                    |   |          |           |               |                |               |        |             |                                        |              |              |              |              |                                |              |

| Havuzlanmış cDNA Kütüphanesinin Denatürasyonu                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |        |        |        |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| 4.6                                                              | 0,2 N NaOH içeren taze bir tüp hazırlayın (0,2 N NaOH maksimum 12 saat stabildir)<br>4.5 adımımda elde edilen havuzlanmış kütüphaneyi kullanılan dizileme protokolüne göre denatüre edin:                                                                                                                                                                |        |        |        |
|                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1 nM   | 2 nM   | 4 nM   |
|                                                                  | Havuzlanmış kütüphane                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 10 µl  | 5 µl   | 5 µl   |
|                                                                  | 0,2 N NaOH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 10 µl  | 5 µl   | 5 µl   |
| 4.7                                                              | Karışımı kısa bir süre vorteksleyin ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 280 × g'de santrifüjleyin.                                                                                                                                                                                                                                                      |        |        |        |
| 4.8                                                              | Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |        |        |        |
| Denatüre cDNA Kütüphanesinin Seyreltilmesi                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |        |        |        |
| 4.9                                                              | 4.8 adımımda elde edilen denatüre edilmiş cDNA kütüphanesini, kullanılan dizileme protokolüne göre önceden soğutulmuş HT1 tamponu ile seyreltin:<br><b>Not:</b> Karıştırmak için HT1 tamponunu ters çevirin.                                                                                                                                             |        |        |        |
|                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1 nM   | 2 nM   | 4 nM   |
|                                                                  | Denatüre cDNA Kütüphanesi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 20 µl  | 10 µl  | 10 µl  |
|                                                                  | HT1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 480 µl | 490 µl | 990 µl |
|                                                                  | Konsantrasyon                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 20 pM  | 20 pM  | 20 pM  |
| 4.10                                                             | Karıştırmak için birkaç kez ters çevirin, kısa bir süre santrifüj yapın ve buza koyun.                                                                                                                                                                                                                                                                   |        |        |        |
| 4.11                                                             | İstenen nihai girdi konsantrasyonunu vermek için 4.10 adımımdan gelen denatüre edilmiş seyreltilmiş kütüphaneyi, yeni bir 1,5 ml tüpte dizileme protokolüne göre daha da seyreltin.                                                                                                                                                                      |        |        |        |
|                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1 nM   | 2 nM   | 4 nM   |
|                                                                  | Denatüre DNA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 500 µl | 500 µl | 450 µl |
|                                                                  | HT1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 167 µl | 167 µl | 150 µl |
|                                                                  | Nihai konsantrasyon                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 15 pM  | 15 pM  | 15 pM  |
| 4.12                                                             | Karıştırmak için birkaç kez ters çevirin ve ardından puls santrifüj yapın. MiSeq reaktif kartuşuna yüklenmeye hazır olana kadar buza koyun.                                                                                                                                                                                                              |        |        |        |
| Numune Kütüphanesi ve PhiX Kontrolünü (İsteğe Bağlı) Birleştirme |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |        |        |        |
| 4.13                                                             | Illumina'nın MiSeq Protokolüne göre 20 pM PhiX hazırlayın veya 20 pM PhiX kütüphanesini (önceden hazırlanmışsa) buz üzerinde çözündürün. Karıştırmak için ters çevirin ve kısa bir süre santrifüj yapın.                                                                                                                                                 |        |        |        |
| 4.14                                                             | Adım 4.12'de elde edilen numune kütüphanesini ve aşağıdaki PhiX kontrol hacimlerini 1,5 ml'lik bir tüpte birleştirin:<br>a. <b>6 µl</b> Denatüre, seyreltilmiş 20 pM PhiX kütüphanesi<br>b. <b>594 µl</b> Denatüre edilmiş, seyreltilmiş numune kütüphanesi (PhiX eklenmemişse, <b>600 µl</b> denatüre edilmiş, seyreltilmiş numune kütüphanesi ekleyin) |        |        |        |
| 4.15                                                             | Karıştırmak için birkaç kez ters çevirin ve kısa bir süre santrifüjleyin. MiSeq reaktif kartuşuna yüklemeye hazır olana kadar buz içinde bekletin.                                                                                                                                                                                                       |        |        |        |
| MiSeq'de Dizileme                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |        |        |        |
| 4.16                                                             | Yazılım arayüzü “Welcome screen” (Hoş Geldiniz ekranı)nda dizileme çalıştırma ayarları adımlarını başlatmak için “Sequence” (Dizileyi)yi seçin.                                                                                                                                                                                                          |        |        |        |
| 4.17                                                             | Windows 7 kullanıyorsanız,<br>a. Yazılımı uygun örnek sayfasına yönlendirmek için Load Reagents (Reaktifleri Yükle) ekranında “Change Sample Sheet” (Örnek Sayfasını Değiştir) komutunu seçin.                                                                                                                                                           |        |        |        |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <ul style="list-style-type: none"> <li>b. Örnek sayfasına gitmek için “Browse” (Gözet) seçin ve “Open” (Aç) işaretleyin.</li> <li>c. Çalışma parametrelerini gözden geçirmek için “Save and Continue” (Kaydet ve Devam et) seçin ardından “Next” (İleri)yi seçin.</li> <li>d. MiSeq'in yüklenmesi ile devam edin.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 4.18 | <p>Windows 10 kullanıyorsanız,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Run Setup (Çalıştırma Ayarı) Seçeneğinden “Sample Sheet” (Örnek Sayfası) seçeneğini seçin.</li> <li>b. [İsteğe bağlı] BaseSpace'in etkinleştirilmesi: “Use BaseSpace™ Sequence Hub for this run” (Bu çalıştırma için BaseSpace™ Sequence Hub'ı kullan) seçeneğini işaretleyin ve kullanmak için oturum açın.</li> <li>c. Aksi takdirde, “Next” (İleri)yi seçin ve örnek sayfası dosyanızı (.csv) seçmek için göz atın. Bu dosya, doğrulama veya çalıştırma oluşturma için Yerel Çalıştırma Yöneticisine gönderilir.</li> <li>d. [İsteğe bağlı] Yerel Çalıştırma Yöneticisi ikincil analizini atlamak için “Disable Local Run Manager Secondary Analysis” (Yerel Çalışma Yöneticisi İkincil Analizini Devre Dışı Bırak) seçeneğini işaretleyin.</li> <li>e. Gerekirse örnek sayfasındaki hataları giderin.</li> <li>f. “Next” (İleri)yi seçin ve Akış Hücresinin yüklenmesine devam edin.</li> </ul> |
| 4.19 | <p>FASTQ dosyaları oluşturmak için Illumina'nın MiSeq Dizileme protokolüne göre dizilemeye devam edin.</p> <p>MiSeq Sistemi hakkında ek rehberlik için Illumina'nın Sistem Kılavuzu'na bakın:<br/> <a href="https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html">https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html</a></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

## 5. Adım: ADAPT aracılığıyla FASTQ dosyalarının analizi

MiSeq dizileyici tarafından oluşturulan FASTQ dosyaları, yüksek performanslı, güvenlikle uyumlu ve bulut tabanlı bir genomik analiz platformu olan Agendia Veri Analizi Aracı (ADAPT) tarafından işlenecektir. ADAPT'ın MammaPrint® Blueprint® Meme Kanseri Nüksü ve Moleküler Alt Tipleme Kiti (MammaPrint Blueprint Kit) ile birlikte kullanılması amaçlanmıştır. ADAPT, MammaPrint Blueprint NGS Kiti ile işlenen numunelerin entegre analizini ve sonuç raporlamasını sağlar.

Bir hesap oluşturmak, güvenli bir dosya aktarım konnektörü kurmak, kimliksizleştirilmiş hasta verilerini güvenli bir ortamda yüklemek ve analiz etmek ve test sonuçlarını almak dahil olmak üzere ADAPT-CE Kullanıcı kılavuzunda (EM-002) adım adım talimatlar verilmiştir.

ADAPT güvenli, bulut tabanlı bir sistemdir ve aşağıda listelenen tarayıcılar aracılığıyla erişilebilir.

| Tarayıcı                          | Desteklenen Versiyon    | İşletim sistemi       |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Google, Chrome ve Mozilla Firefox | En son kararlı versiyon | Windows, Mac ve Linux |

Başlamadan önce ADAPT-CE Kullanım kılavuzunda (EM-002) verilen tüm talimatları gözden geçirin. Bu talimatları okuduktan sonra sorularınız varsa lütfen yardım için Agendia Ürün Desteği ([NGS.support@agendia.com](mailto:NGS.support@agendia.com)) ile iletişime geçin.



## Sonuçlar

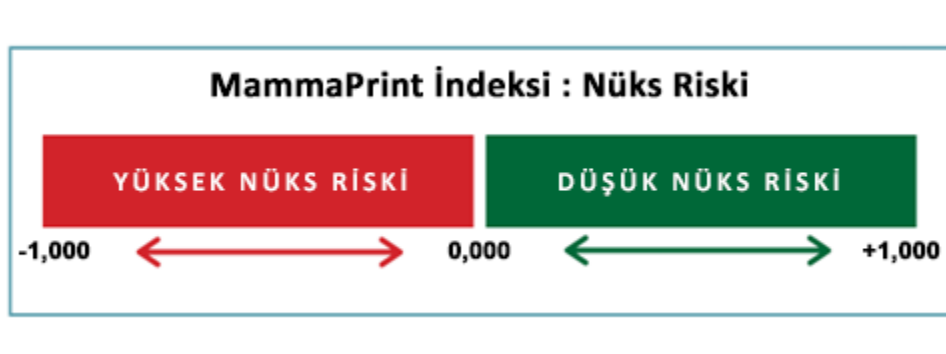
Kullanıcı örnek başına iki belge alır: Teknik Rapor ve Sonuçların Açıklaması. Teknik Rapor, kalite kontrol bilgileri ve MammaPrint Blueprint NGS Kit sonuçları MammaPrint indeksi (MPI), nüks riskinin belirlenmesi (Yüksek Risk veya Düşük Risk) ve Blueprint sonucunu (Luminal Tip, HER2 Tipi veya Bazal Tip) içerir) dahil olmak üzere numune ve ADAPT işlemi hakkında bilgi içerir. Daha ayrıntılı bilgi için Sonuçların Yorumlanması bölümüne bakın. Sonuçların Açıklaması, test sonuçlarını yayınlanmış klinik veriler bağlamında açıklar.

## Sonuçların Yorumlanması

Bir test sonucu, yalnızca Teknik Rapordaki Overall Assessment (Genel Değerlendirme) alanında “Pass” (Başarılı) yazıyorsa geçerli sayılır. Kalite kontrol metriklerinden herhangi biri başarısız olursa, Genel Değerlendirme de “Fail” (Başarısız) olduğunu gösterecektir. Genel Değerlendirme “Başarısız” sonucunu gösteriyorsa, Teknik Rapor, Test Results (Test Sonuçları) bölümünde “Unable to provide result for this specimen” (Bu numune için sonuç verilemiyor) görülür ve Sonuçların Açıklaması belgesi sağlanamaz. Test laboratuvarı, sonraki sonucun geçerli bir test sonucuyla sonuçlanıp sonuçlanmayacağını görmek için numuneyi yeniden test etmeyi seçebilir.

## MammaPrint

MammaPrint sonucu ikili bir sonuç olarak verilir ve nüks riski bakımından “Düşük Risk” veya “Yüksek Risk” olabilir. Numunenin prognostik profili (Düşük Risk, Yüksek Risk) MPI -1,000 ile +1,000 arasında bir ölçekte hesaplanarak belirlenir (MammaPrint FFPE raporlanabilir aralığı, Şekil 2). Yüksek Risk sonuçlarında MammaPrint İndeksi (MPI) 0,000'e eşit veya altındayken, Düşük Risk sonuçlarında MPI 0,000'in üzerindedir. MPI, -0,058 ile +0,058 arasındaki sınıflandırma kesme noktası etrafında önceden tanımlanmış bir alana düşerse, sınıflandırma doğruluğu %90'dan azdır.



Şekil 2: MammaPrint İndeksi

## Blueprint

Blueprint, meme kanserini üç farklı alt tipe (Luminal Tip, HER2 Tipi ve Bazal Tip) ayıran bir moleküler alt tiplendirme testi olup bunu söz konusu 3 farklı moleküler alt tip arasında en iyi ayırım yapan 80 tane genin mRNA seviyelerini belirleyerek yapar. Bu alt tiplerin her biri, uzun vadeli akıbet ve (neo)adjuvan kemoterapiye yanıt açısından belirgin farklılıklara sahiptir [10]. MammaPrint ve Blueprint'in birleştirilmesi, hastaların alt gruplara ayrılmasını sağlar: Luminal Tip/MammaPrint Düşük Risk (Luminal A'ya benzer); Luminal Tip/MammaPrint Yüksek Risk (Luminal B'ye benzer); HER2 Tipi ve Bazal Tip.

## Prosedürün Sınırlamaları

- MammaPrint Blueprint Meme Kanseri Nüksü ve Moleküler Alt Tiplendirme Kiti, yalnızca kadın hastalardan alınan FFPE meme kanseri tümör dokusu ile kullanım için doğrulanmıştır. Diğer numune türlerinin veya diğer koruma yöntemlerinin test edilmesi değerlendirilmemiştir.
- RNeasy FFPE kiti bu testte kullanım için geçerlenmiştir. Diğer RNA izolasyon kitlerinin kullanımı değerlendirilmemiştir.
- MammaPrint Blueprint NGS Kiti, Illumina MiSeq V3 reaktifleri ile birlikte 150 döngü olacak şekilde doğrulanmıştır. Diğer DNA dizileycilerinin ve diğer reaktiflerin kullanımı değerlendirilmemiştir.
- MammaPrint sonucunun Düşük Risk olması, meme kanserinin beş yıl içinde tekrarlamayacağını garanti etmez. Benzer şekilde, Yüksek Risk sonucu, meme kanserinin tekrarlayacağını garanti etmez. Test sonuçları klinikopatolojik faktörlerle birlikte kullanılmalıdır.
- MammaPrint Blueprint NGS sonuçları doktorlar tarafından kullanım için endikedir ve diğer standart klinikopatolojik faktörlerle birlikte yorumlanmalıdır. Test, hastalığın akıbetini belirlemek için tasarlanmamıştır.

## Beklenen Değerler

### MammaPrint

Popülasyona dayalı çalışmalardan elde edilen klinik veriler, MammaPrint testinin amaçlanan kullanım popülasyonunda klinik faydasını göstermiştir. MammaPrint, östrojen Reseptörü (ER) veya HER2 durumundan bağımsız olarak, tümör boyutu  $\leq 5,0$  cm ve nodal mikro metastazlar için özel spesifikasyon olmaksızın 0-3 pozitif lenf düğümü (LN 0-3) olan erken evre (I, II ve III) meme kanseri hastalarında kullanılmak üzere prospektif klinik çalışmalarda klinik olarak geçerlenmiştir. MINDACT çalışmasında birincil analiz, Klinik Olarak Yüksek Riskli/Genomik Olarak MammaPrint Düşük Riskli (C-Yüksek/G-düşük) hastalarda kemoterapinin kesilmesinin akıbette yıkıcı etki yapmadığını göstermiştir. MammaPrint Düşük Riskli, 1-3 lenf nodu pozitif olan hastalarda 5. yılda adjuvan sistemik kemoterapiden anlamlı bir fayda gözlenmemiştir [11]. Bu çalışma ve diğer yayınlanmış çalışmalarda, [8] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18], MammaPrint testinin erken evre meme kanseri olan kadınlarda klinik akıbet tahminini iyileştirdiği gösterilmiştir.

### BluePrint

Bazal Tip meme kanserleri, kökeni bazal/miyoeitel olan hücrelerin gen ekspresyonu ile karakterizedir. Bazal Tip kanserler tipik olarak ER, PR ve HER2 (bazal benzeri) bakımından üçlü negatiftir ve spesifik bir gen ekspresyonu profiline sahiptir. Kemoterapinin yararlı olduğu düşünülse de hormon tedavisi ve trastuzumab ve lapatinib gibi anti-HER2 tedavilerinin bu kanserlere karşı etkili olduğuna inanılmamaktadır.

Luminal Tip meme kanserleri, meme kanallarını ve bezlerini kaplayan luminal epitel hücrelerin gen ekspresyonu ile karakterizedir. Luminal Tipteki kanserler tipik olarak hormon reseptörü pozitif tümörlerdir ve hormonal tedaviye yanıt vermeleri olasıdır. MammaPrint Düşük Riskli ve Luminal Tip olarak sınıflandırılan hastaların genellikle hormonal tedavi ile tedavi edilen Luminal A'ya benzer bir klinik seyir göstermesi beklenirken, MammaPrint Yüksek Riskli ve Luminal Tip sonuçları olanların genellikle kemoterapi içerebilecek daha agresif tedaviden yararlanan Luminal B hastalarına benzer bir klinik seyir göstermeleri beklenebilir.

HER2 Tipi meme kanserleri, HER2 lokusunun amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu ile karakterizedir ve tipik olarak IHC veya FISH (HER2/neu pozitif) ile gösterilen HER2 pozitif tümörlerdir. Bu kanserler daha hızlı büyüme eğilimindedir ve tekrarlayabilir, ancak sıklıkla anti-HER2 tedavileri ile tedavi edilebilir.

## Performans Özellikleri

MammaPrint Blueprint Meme Kanseri Tekrarlama ve Moleküler Alt Tipleme Kitinin kesinliğini, tekrarlanabilirliğini ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini tahmin etmek için analitik ve klinik geçirme çalışmaları yapılmıştır ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

### MammaPrint

#### Analitik Performans

NGS temelli MammaPrint testi ile şu anda pazarda olan mikrodizi teknolojisine dayalı MammaPrint FFPE arasındaki uyum, 85 FFPE örneğinden RNA kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm testler Agendia'nın Amsterdam, Hollanda'daki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Test performansı, pozitif yüzde uyumu (PPA), negatif yüzde uyumu (NPA) ve iki test arasındaki genel uyum hesaplanarak belirlenmiştir. PPA, NPA ve genel uyum sırasıyla %100, %94 ve %98 olmuştur.

NGS temelli MammaPrint testinin tekrarlanabilirliği, her iki MammaPrint risk kategorisini (MammaPrint Yüksek Risk ve Düşük Risk) temsil eden üç FFPE doku örneğinden izole edilen RNA kullanılarak zaman içinde değerlendirilmiştir. Numuneler, Agendia'nın Amsterdam/Hollanda ve Irvine, Kaliforniya/ABD'deki laboratuvarlarında birden fazla operatör tarafından farklı günlerde birden çok kez analiz edilmiştir. Gün başına tek bir çalışma yapılmıştır: Örnek 1'de 25 ölçüm, Örnek 2'de 17 ölçüm ve Örnek 3'te 14 ölçüm gerçekleştirilmiştir. MammaPrint indeksine göre medyan nispi tekrarlanabilirlik %98 olmuştur.

Tekrarlanabilirlik, aynı FFPE doku örneğinden elde edilen iki RNA izolasyonu arasında toplam 43 örnek için değerlendirilmiştir. 43 doku örneğinin iki izolasyonu aynı gün Agendia'nın Amsterdam, Hollanda'daki laboratuvarında analiz edilmiştir. Bu 43 numune kullanılarak birinci ve ikinci izolasyon arasındaki MammaPrint sonuçlarının uyumu %98 olmuştur.

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, iki harici Avrupa tesisinde ve Agendia'nın Amsterdam, Hollanda'daki laboratuvarında değerlendirilmiştir. Toplamda, 16 FFPE örneğinden izole edilen RNA, test için üç tesise gönderilmiştir. 16 örnek, her tesiste en az iki operatöre bölünmüştür. İki dış tesis ve Agendia arasındaki laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik belirlenmiştir. Genel uyum %100 olmuştur.

MammaPrint ve Blueprint NGS Kitinin test sonuçlarına olası girişimi belirlemek için birkaç madde değerlendirilmiştir (örn. gDNA, Prot. K, Actinomycin D, etanol ve sodyum hidroksit). Test edilen hiçbir madde, MammaPrint ve Blueprint test sonuçlarını etkilememiştir.

Tespit sınırı (LoD), yakalama sonrası materyal üzerinde belirlenmiştir ve değerlendirmede MiSeq üzerinde farklı molarite seviyeleri değerlendirip 0,4 nM'lik bir LoD ile sonuçlanmıştır. Yakalanmış malzemenin molarite eşiği, LoD'nin çok üzerinde olan 1,0 nM olmuştur.

## Klinik Performans

NGS temelli MammaPrint testinin klinik performans özellikleri, 2004-2006 yılları arasında kaydedilen tümör boyutu  $\leq 5,0$  cm ve lenf nodu negatif veya 1-3 lenf nodu pozitif olan, I. evre veya II. evre meme kanseri hastalarından retrospektif olarak toplanan ve arşivlenen 316 FFPE meme tümörü doku örneğinden oluşan bir çalışma kohortu kullanılarak değerlendirilmiştir. MammaPrint testinin klinik performansını desteklemek için 316 numune, uzak metastaz veya meme kanserinden ölüm tanısına kadar geçen süre olan Uzak Nüks Olmaksızın Zaman Aralığı (DRFI) için 5 yıllık akıbet verileriyle değerlendirilmiştir. Beklendiği gibi, bu veriler 5 yıllık DRFI için MammaPrint Yüksek ve Düşük Risk grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir (LogRank  $p=0,002$ ). Belirtmek gerekir ki, bu çalışma kohortunda hem Yüksek hem de Düşük Risk grupları için NGS temelli MammaPrint testinin klinik performansı, şu anda pazarda bulunan mikrodizi teknolojisine dayalı MammaPrint FFPE'nin performansına istatistiksel olarak eşdeğerdir (Yüksek Risk  $p=0,83$ , Düşük Risk  $p=0,44$ ).

Son olarak, iki bağımsız saha Avrupa tesisinde bir saha korelasyonu çalışması yapılmıştır. Meme kanseri örnekleri, amaçlanan kullanım popülasyonundaki (yani, I. evre veya II. evre hastalık, tümör boyutu  $\leq 5,0$  cm ve lenf nodu negatif veya 1-3 lenf nodu pozitif) 95 hastadan prospektif olarak alınmıştır. Bu numuneler, saha tesislerinde NGS temelli MammaPrint testinde işlenmiş ve dokunun bir kısmı, NGS temelli MammaPrint testinin yanı sıra şu anda pazarda bulunan mikrodizi teknolojisine dayalı MammaPrint FFPE ile test edilmek üzere Amsterdam, Hollanda'daki Agendia laboratuvarına gönderilmiştir. Tayin performansı, saha tesislerinde elde edilen NGS MammaPrint testi sonuçları ile Agendia'da elde edilen NGS temelli MammaPrint testi ve MammaPrint FFPE sonuçları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sahada yapılan NGS temelli MammaPrint testi ile Agendia'da yapılan NGS temelli MammaPrint testi arasındaki uyumluluk 86 numune bazında %93 bulunmuştur. Benzer şekilde, sahada gerçekleştirilen NGS temelli MammaPrint testi ile Agendia'da gerçekleştirilen mikrodiziye dayalı MammaPrint FFPE arasındaki uyum %91 olmuştur.

## BluePrint

### Analitik Performans

NGS temelli BluePrint testi ile şu anda pazarda bulunan mikrodizi teknolojisine dayalı BluePrint FFPE arasındaki uyum 98 FFPE RNA örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm testler Agendia'nın Amsterdam, Hollanda'daki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tayin performansı, iki test arasındaki genel uyum hesaplanarak belirlenmiştir, ki bu %100 olmuştur. NGS ve mikrodizi platformlarından elde edilen BluePrint sonuçları arasında 316 örnek kullanılarak ek bir karşılaştırma yapılmıştır. Bu karşılaştırmaya dayanarak genel uyum %98, Luminal, Her2 ve Bazal alt tip için ayrı ayrı uyum sırasıyla %100, %75 ve %96 olmuştur.

NGS temelli BluePrint testinin tekrarlanabilirliği, BluePrint'in farklı sonuç seviyelerini (Luminal Tip, HER2 Tipi ve Bazal Tip) temsil eden üç FFPE doku örneğinden izole edilen RNA kullanılarak zaman içinde değerlendirilmiştir. Numuneler, Agendia'nın Amsterdam/Hollanda ve Irvine, Kaliforniya/ABD'deki laboratuvarlarında birden fazla operatör tarafından farklı günlerde birden çok kez analiz edilmiştir. Gün başına tek bir çalışma yapılmıştır: Örnek 1'de 25 ölçüm, Örnek 2'de 17 ölçüm ve Örnek 3'te 14 ölçüm

gerçekleştirilmiştir. Luminal Tip için BluePrint indeksindeki medyan nispi tekrarlanabilirlik %98, HER2 Tipi için %98 ve Bazal Tip için %98 olmuştur.

Tekrarlanabilirlik, toplam 43 örnek için aynı FFPE dokusundan elde edilen iki RNA izolasyonu arasında değerlendirilmiştir. 43 doku örneğinin iki izolasyonu, aynı gün NGS temelli BluePrint testinde analiz edilmiştir. Bu 43 numunenin birinci ve ikinci izolasyonu arasındaki uyum %100 olmuştur.

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, iki harici Avrupa tesisinde ve Agendia'nın Amsterdam, Hollanda'daki laboratuvarında değerlendirilmiştir. 16 FFPE örneğinden izole edilen RNA test için üç tesise gönderilmiştir. 16 örnek, her tesiste en az iki operatöre bölünmüştür. İki dış tesis ve Agendia arasındaki laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik belirlenmiştir. Genel uyum %100 olmuştur.

#### Klinik Performans

İki bağımsız Avrupa saha tesisinde bir saha korelasyonu çalışması yürütülmüştür. Meme kanseri örnekleri, amaçlanan kullanım popülasyonundaki (yani, I. evre veya II. evre hastalık, tümör boyutu  $\leq 5,0$  cm ve lenf nodu negatif veya 1-3 lenf nodu pozitif) 95 hastadan prospektif olarak alınmıştır. Bu numuneler NGS temelli BluePrint testinde saha tesislerinde işlenmiş ve dokunun bir bölümü NGS temelli BluePrint testinin yanı sıra şu anda pazarda bulunan mikrodizi teknolojisine dayalı BluePrint FFPE'yi test etmek için Agendia'nın Amsterdam, Hollanda'daki laboratuvarına gönderilmiştir. Tayin performansı, saha tesislerinde elde edilen NGS BluePrint testi sonuçları ile Agendia'da elde edilen NGS temelli BluePrint testi ve BluePrint FFPE sonuçları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sahada gerçekleştirilen NGS temelli BluePrint testi ile Agendia'da gerçekleştirilen NGS temelli BluePrint testi arasındaki 86 numune içeren uyumluluk %100 olmuştur. Benzer şekilde, sahada gerçekleştirilen NGS temelli BluePrint testi ile Agendia'da gerçekleştirilen mikrodiziye dayalı BluePrint FFPE arasındaki uyum %98 olmuştur.

## Yardım

Bu ürünün kullanımıyla ilgili herhangi bir sorunuz varsa, lütfen [NGS.support@agendia.com](mailto:NGS.support@agendia.com) adresinden veya **+31 (0) 20 462 1510** numaralı telefondan pazartesi-cuma 08:30-17:00 (GMT/UTC +1) saatleri arasında Agendia NGS destek birimiyle iletişime geçin.

## İşletmenin Adı ve Adresi



Agendia NV

Radarweg 60

1043NT Amsterdam

Hollanda

Telefon: +31 (0) 20 462 1510

e-posta: [customerservice@agendia.com](mailto:customerservice@agendia.com)



**Temel UDI-DI:** 085002484193128042

## Düzenlendiği Tarihi

Şubat 2025 versiyon 7

### **Önceki versiyona göre yapılan değişiklikler**

Uyarı ve önlemler bölümü, 3. madde imi güncellendi, "yalnızca prognostik bir belirteçi olarak" ifadesi kaldırıldı — MKT-339v7

MP ve BP kullanım amacının genişletilmesi; kullanım amacı, uyarı ve önlemler, prosedür sınırlamaları bölümlerinde güncellemeler, UDI- MKT-339 v6'ya eklendi

Ek bilgi BP eklendi — MKT-339 v5

2.37 adımı düzeltildi — MKT-339 v4

Windows 10 eklendi — MKT-339 v3

Web sitesi güncellendi — MKT-339 v2

İlk yayın — MKT-339-v1

## Tavsiye Bildirimi:

MammaPrint ve Blueprint NGS Kit ve ADAPT ile ilgili ciddi olayları üreticiye ve Üye Devletin yetkili makamına bildirin. Üretici, ciddi olayı kullanıcı/hastanın bulunduğu Üye Devletin yetkili makamına bildirecektir.



© 2021 Agendia. Tüm hakları saklıdır.

Agendia®, MammaPrint® ve Blueprint®, Agendia NV ve/veya ABD'deki bağlı kuruluşunun ticari markalarıdır. Diğer tüm isimler ve diğer ticari markalar ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.

Bu belgedeki talimatlara, burada açıklanan ürünün doğru ve güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlamak için nitelikli ve uygun şekilde eğitilmiş personel tarafından sıkı bir şekilde uyulması gereklidir. BURADA YER ALAN TÜM TALİMATLARIN TAMAMEN OKUNMAMASI VE AÇIKÇA TAKİP EDİLMEMESİ, ÜRÜNE ZARAR VEREBİLİR, KULLANICILAR VEYA BAŞKALARI DA DAHİL OLMAK ÜZERE KİŞİLERİN YARALANMASINA NEDEN OLABİLİR. AGENDIA, BURADA AÇIKLANAN ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN (BUNLARIN PARÇALARI VEYA YAZILIMLARI DAHİL) UYGUNSUZ KULLANIMINDAN KAYNAKLANAN HERHANGİ BİR SORUMLULUĞU KABUL ETMEZ.



## Semboller

Ürün ambalajı ve etiketlemesinde görünebilecek sembollere eksiksiz referans için aşağıdaki sembol anahtarına bakın.

| Sembol                                                                              | Sembolün Başlığı                        | Sembolün Açıklaması                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Üretici                                 | (AB) 2017/746 Yönetmeliğinde tanımlandığı gibi tıbbi cihaz üreticisini belirtir                                                                                                                  |
|    | Son kullanma tarihi                     | Geçildiğinde tıbbi cihazın kullanılmayacağı tarihi belirtir.                                                                                                                                     |
|    | Parti kodu                              | Parti veya lotun tanımlanabilmesi için üreticinin parti kodunu gösterir.                                                                                                                         |
|    | Katalog numarası                        | Tıbbi cihazın tanımlanabilmesi için üreticinin katalog numarasını gösterir.                                                                                                                      |
|    | Güneş ışığından uzak tutun              | Işık kaynaklarından korunması gereken tıbbi bir cihazı gösterir.                                                                                                                                 |
|    | Sıcaklık sınırı                         | Tıbbi cihazın güvenli bir şekilde maruz kalabileceği sıcaklık sınırlarını gösterir.                                                                                                              |
|    | Kullanım talimatlarına bakın            | Kullanıcının kullanım talimatlarına başvurması gerektiğini gösterir.                                                                                                                             |
|  | Dikkat                                  | Çeşitli nedenlerle tıbbi cihazın kendisi üzerine yerleştirilemeyen uyarılar ve önlemler gibi önemli uyarıcı bilgiler için kullanıcının kullanım talimatlarına başvurması gerektiğini ifade eder. |
|  | <i>In vitro</i> tanı amaçlı tıbbi cihaz | <i>In vitro</i> tanısal tıbbi cihaz olarak kullanılması amaçlanan bir tıbbi cihazı ifade eder.                                                                                                   |
|  | Ambalaj hasar görmüşse kullanmayın      | Ambalaj hasar görmüş veya açılmışsa kullanılmaması gereken tıbbi cihazı belirtir                                                                                                                 |
|  | Testler için yeterli miktarda içerir    | IVD ile yapılabilecek toplam IVD testi sayısını gösterir.                                                                                                                                        |
|  | Göz koruması kullanın                   | Göz koruması kullanın                                                                                                                                                                            |
|  | Koruyucu eldiven giyin                  | Koruyucu eldiven giyin                                                                                                                                                                           |
|  | Koruyucu kıyafet giyin                  | Koruyucu kıyafet giyin                                                                                                                                                                           |

|                                                                                   |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Korozyon         | Metaller için aşındırıcı olabilir<br>Ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına neden olur                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|  | Sağlık Tehlikesi | Yutulduğunda ve hava yollarına girerse<br>ölümcül olabilir<br>Organlara zarar verir<br>Organlara zarar verebilir<br>Doğurganlığa veya anne karnındaki çocuğa zarar verebilir<br>Doğurganlığa veya anne karnındaki çocuğa zarar verdiği şüphesi bulunmaktadır<br>Kansere neden olabilir<br>Kansere neden olduğu şüphesi bulunmaktadır<br>Genetik kusurlara neden olabilir<br>Genetik kusurlara neden olduğu şüphesi bulunmaktadır<br>Solunduğunda alerji veya astım semptomlarına veya solunum güçlüğüne neden olabilir |

## Bibliyografya

- [1] J. C. Haan, R. Bhaskaran, A. Ellappalayam, Y. Bijl, C. Griffioen, W. Audeh, F. Penault-Llorca, L. Mittempergher and A. Glas, "MammaPrint and Blueprint comprehensively capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients," *Genes Chromosomes Cancer*, pp. 148-160, 2021.
- [2] L. J. van 'Veer, H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven and C. Robert, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature*, vol. 415, pp. 530 - 535, 2002.
- [3] M. J. van de Vijver, Y. D. He, L. J. van't Veer, D. Hongyue, A. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen and A. Glas, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 25, pp. 1999 - 2009, 19 December 2002.
- [4] A. M. Glas, A. Floore, L. J. Delahaye, A. T. witteveen, P. R. C.F., N. L.-D. J. S. Bakx, T. J. Bruinsma, M. O. Warmoes, R. Bernards, L. F. Wessels and L. J. van 't Veer, "Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test," *BMC Genomics*, October 2006.
- [5] O. Krijgsman, P. Roepman, W. Zwart, J. S. Carroll, S. Tian, F. A. de Snoo, R. A. Bender, R. Bernards and A. M. Glas, "A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 133, no. 1, pp. 37-47, 2012.
- [6] S. Mook, M. K. Schmidt, B. Weigelt, B. Kreike, I. Eekhout, M. J. van de Vijver, A. M. Glas, A. Floore, E. J. T. Rutgers and L. J. van 't Veer, "The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age.," *Annals of Oncology*, vol. 21, no. 4, pp. 717-722, 2009.
- [7] M. Buyse, L. Sherene, v. ' . V. Laura, G. Viale, M. Delorenzi, A. M. Glas, M. Saghastchian d'Assignies, B. Jonas, R. Lideau, P. Ellis, A. Harris, J. Bogaerts, P. Therasse and A. Floore, "Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women with Node-Negative Breast Cancer," *Journal of the Nat. Can. Int.*, vol. 98, no. 17, pp. 1183 - 1192, 6 September 2006.
- [8] C. Drukker, J. Bueno-de-Mesquita, V. Retel, W. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, R. Roumen, M. Knauer, L. van 't Veer, G. Sonke, E. Rutgers, M. van de Vijver and S. Linn, "A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study," *International Journal of Cancer*, vol. 133, pp. 929 - 936, January 2013.
- [9] I. Beumer, A. Witteveen, L. Delahaye, D. Wehkamp, M. Snel, C. Dreezen, J. Zheng, A. Floore, G. Brink, B. Chan, S. Linn, R. Bernards, L. van 't Veer and A. Glas, "Equivalence of MammaPrint array types in clinical trials and diagnostics," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 156, no. 2, pp. 279-287, 2016.

- [10] S. Gluck, F. de Snoo, J. Peeters, L. Stork-Sloots and G. Somlo, "Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 139, no. 3, pp. 759-767, 2013.
- [11] M. Piccart, L. J. van 't Veer, C. Poncet, J. M. N. Lopes Cardozo, S. Delaloge, J.-Y. Pierga, P. Vuylsteke, E. Brain, S. Vrijaldenhoven, P. A. Neijenhuis, S. Causeret, T. J. Smilde, G. Viale, A. M. Glas, M. Delorenzi, C. Sotiriou, I. T. Rubio, S. Kümmel, G. Zoppoli, A. M. Thompson, E. Matos, K. Zaman, F. Hilbers, D. Fumagalli, P. Ravdin, S. Knox, K. Tryfonidis, A. Peric, B. Meulemans, J. Bogaerts, F. Cardoso and E. J. T. Rutgers, "70-gene signature as an aid for treatment decisions in early breast cancer: updated results of the phase 3 randomised MINDACT trial with an exploratory analysis by age," *Lancet Oncology*, vol. 22, no. 4, pp. 476-488, 2021.
- [12] K. Yao, R. Goldschmidt, M. Turk, J. Wesseling, L. Stork-Sloots, F. de Snoo and M. Cristofanilli, "Molecular subtyping improves diagnostic stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups," *Breast Cancer Research Treatment*, vol. 154, no. 1, pp. 81-8, 2015.
- [13] L. Esserman, C. Yau, C. K. Thompson, L. J. van 't Veer, A. D. Borowsky, K. A. Hoadley, N. P. Tobin, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, C. C. Benz and L. S. Lindström, "Use of Molecular Tools to Identify Patients With Indolent Breast Cancers With Ultralow Risk Over 2 Decades," *JAMA Oncology*, no. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1261, 2017.
- [14] S. Mook, M. K. Schmidt, G. Viale, G. Pruneri, I. Eekhout, A. Floore, A. M. Glas, J. Bogaerts, F. Cardoso, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, L. J. Van't Veer and T. C. , "The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 116, no. 2, pp. 295-302, 2009.
- [15] L. J. van 't Veer, C. Yau, N. Y. Yu, C. C. Benz, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, L. J. Esserman and L. S. Lindström, "Tamoxifen therapy benefit for patients with 70-gene signature high and low risk," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 166, no. 2, pp. 593-601, 2017.
- [16] J. M. Bueno-de-Mesquita, W. H. van Harten, V. P. Retel, L. J. van 't Veer, F. Sam van Dam, K. Karsenberg, K. F. Douma, H. van Tinteren, J. L. Peterse, J. Wesseling, T. S. Wu, D. Atsma, E. J. Rutgers, G. Brink, A. N. Floore, A. M. Glas, R. M. Roumen, F. E. Bellot, C. van Krimpen, S. Rodenhuis, M. J. van de Vijver and S. C. Linn, "Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER)," *Lancet Oncology*, vol. 8, no. 12, pp. 1079-1087, 2007.
- [17] B. S. Wittner, D. C. Sgroi, P. D. Ryan, T. J. Bruinsma, A. M. Glas, A. Male, S. Dahiya, K. Habin, R. Bernards, D. A. Haber, L. J. Van't Veer and S. Ramaswamy, "Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 2988-93, 2008.

- [18] L. J. Delahaye, D. Wehkamp, A. N. Floore, R. Bernards, L. J. van 't Veer and A. M. Glas, "Performance characteristics of the MammaPrint breast cancer diagnostic gene signature," *Personalized Medicine*, vol. 10, no. 8, pp. 801-811, 2013.

## Ek A: MammaPrint Blueprint NGS 8 bp İndekslerinin Nükleotid Dizileri

Tablo 1: MammaPrint Blueprint Kit A01 ila H04 İndekslerinin Nükleotid Dizileri

| İndeks (plaka koordinatı) | Sıra     |
|---------------------------|----------|
| A01                       | ATGCCTAA |
| B01                       | GAATCTGA |
| C01                       | AACGTGAT |
| D01                       | CACTTCGA |
| E01                       | GCCAAGAC |
| F01                       | GACTAGTA |
| G01                       | ATTGGCTC |
| H01                       | GATGAATC |
| A02                       | AGCAGGAA |
| B02                       | GAGCTGAA |
| C02                       | AAACATCG |
| D02                       | GAGTTAGC |
| E02                       | CGAACTTA |
| F02                       | GATAGACA |
| G02                       | AAGGACAC |
| H02                       | GACAGTGC |
| A03                       | ATCATTCC |
| B03                       | GCCACATA |
| C03                       | ACCACTGT |
| D03                       | CTGGCATA |
| E03                       | ACCTCCAA |
| F03                       | GCGAGTAA |
| G03                       | ACTATGCA |

|     |          |
|-----|----------|
| H03 | CGGATTGC |
| A04 | AACTCACC |
| B04 | GCTAACGA |
| C04 | CAGATCTG |
| D04 | ATCCTGTA |
| E04 | CTGTAGCC |
| F04 | GCTCGGTA |
| G04 | ACACGACC |
| H04 | AGTCACTA |