

Los kits OGB producidos por Sequencing Multiplex SL (Seqplexing) permiten la rápida generación de librerías para Secuenciación de Nueva Generación (NGS).

- El protocolo es sencillo y se basa en una amplificación de las regiones de interés y la reamplificación-marcado de estas regiones con las secuencias necesarias para la reacción de NGS (Ver Figura 1).
- Las librerías pueden obtenerse en unas 5 horas con menos de 10 minutos de trabajo manual.
- Las librerías obtenidas tienen una baja tasa de error en la secuenciación y tienen una alta especificidad (más del 97% de las lecturas corresponden a las regiones de interés).
- Cada kit está diseñado para analizar mutaciones somáticas y germinales en genes o regiones "hot spot" de diferentes genes que tienen utilidad en la clínica.

### PROTOCOLO

El protocolo para nuestros kits es muy sencillo y se basa en 4 puntos:

- Añadir el ADN problema a las mezclas de reacción 1.
- Realizar ciclos de PCR 1.
- Añadir los productos de la primera PCR en la mezcla de reacción 2
- Realizar ciclos de PCR 2.

Una vez finalizada la PCR2 ya tendríamos la librería para proceder a su secuenciación. Las librerías pueden visualizarse de forma sencilla mediante Qiaxcel (Qiagen), gel de agarosa, etc.

CONTACTO:

[www.seqplexing.com](http://www.seqplexing.com)  
e-mail: info@seqplexing.com  
Tel: +34 96 354 32 63

### VENTAJAS

**Mínimo tiempo de trabajo manual:** menos de 10 minutos, uso de mezclas "ready to use".

**Mínima manipulación.** Reduce el riesgo de errores y contaminaciones. Uso de mezclas "ready to use".

**Alta sensibilidad.** Detección de variantes presentes hasta un 1% de las copias.

**Muestras:** Resultados positivos a partir de 10 ng de ADN obtenido de muestras parafinadas, sangre, saliva, etc.

**Especificidad:** más del 97% de las lecturas corresponden a las regiones de interés lo que supone una reducción de costes al reducir la lecturas necesarias.

**Alto valor clínico.** Detección de todas las mutaciones relevantes para cada uno de los genes o estudios de interés.

Compatible con el sistema Nextera de Illumina®.

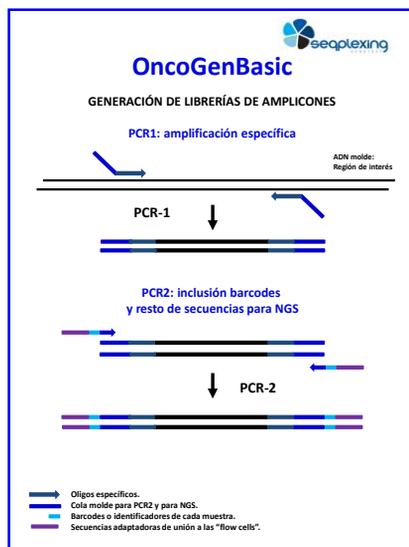


Figura 1: Esquema del procedimiento de generación de librerías.

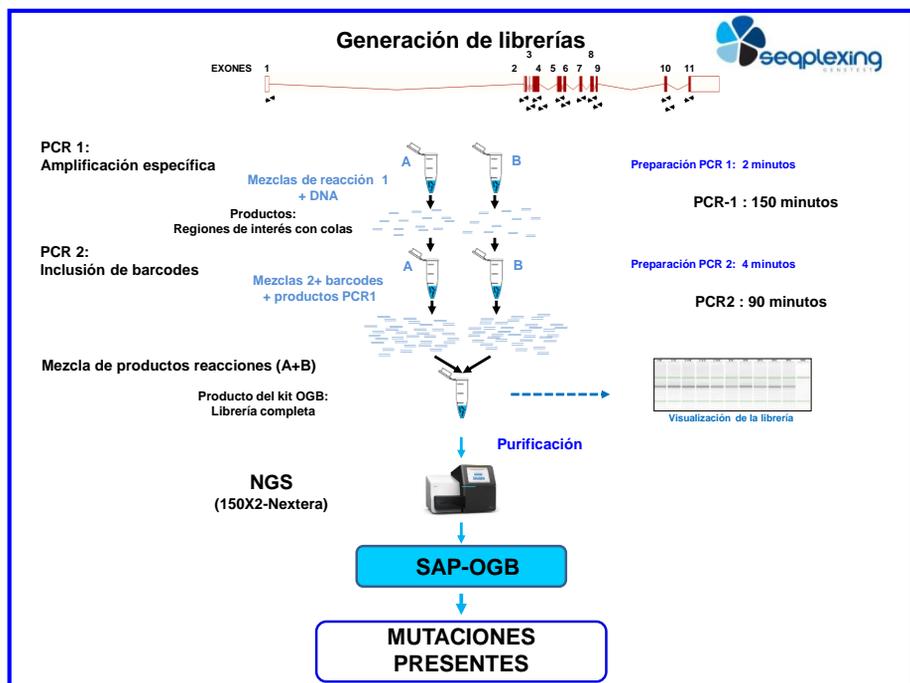


Figura 2: Esquema del procedimiento completo.

## Análisis de mutaciones en las regiones “hot spot” de los genes BRAF, EGFR, KRAS, NRAS

### IMPORTANCIA DE ESTAS MUTACIONES EN LOS GENES BRAF, EGFR, KRAS y NRAS

Mutaciones en estos genes son muy frecuentes en multitud de tipos de tumores. Algunos tumores pueden presentar mutaciones hasta en el 50% de estos genes. Las mutaciones están localizadas en determinadas regiones que tienen un efecto pro-cancerígeno. Las regiones analizadas son:

GEN	EXONES
BRAF	6, 11, 13, 15, 18
EGFR	12, 18-21
KRAS	2-5
NRAS	2-4

Las mutaciones en las regiones indicadas tienen implicaciones importantes en el tratamiento de cáncer de colorrectal, pulmón, ovario, melanoma, tiroides, etc. El estudio de todos ellos o de algún gen en concreto, es necesario para el tratamiento con determinados fármacos según normas de la FDA y la EMA.

En algunos casos, además, pueden aparecer mutaciones de resistencia a los fármacos tras su utilización. Así, se han descrito mutaciones en EGFR que confieren resistencia a este tratamiento como las mutaciones T790M (E20) y S492R (E12) de EGFR como respuesta a tratamiento con anti-EGFR (Montagut, Nat Med. 2012;18:221).

OG-P1 permite generar librerías de NGS y la identificación de mutaciones puntuales somáticas en las regiones “hot spot” de los genes BRAF, EGFR, KRAS y NRAS.

El procedimiento para generar estas librerías es sencillo y rápido. Se basa en amplicones que cubren las regiones de interés. El kit origina las librerías mediante dos PCRs multiplex consecutivas.

El protocolo consiste en:

- Añadir el ADN problema a las mezclas de reacción “ready to use”: PCR1-A y PCR1-B.
- Realizar los ciclos de PCR.
- Añadir el correspondiente producto de la PCR1 directamente (no hace falta purificarlo) a las reacciones PCR2-A y PCR2-B.
- Realizar los ciclos de PCR y mezclar los productos.

El producto de esta reacción es la librería lista para utilizarse según los protocolos de NGS de sistemas Illumina®.

Tras la reacción se analizan los datos con nuestro software Small Amplicons Platform (SAP-OGP) para identificar las mutaciones presentes en cada muestra.

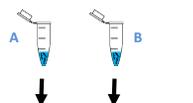
### OncoGenBasic-P1



#### Generación de librerías

PCR 1:  
Amplificación de las regiones de interés.

Premixes 1 + DNA



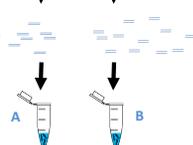
Preparación PCR 1:  
(2 tubos/muestra): 2 minutos

PCR 1 : 150 minutos

Productos:  
Regiones de interés con colas

PCR 2:  
Inclusión de barcodes

Premix 2+ barcodes + PCR1 products

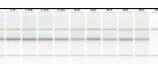


Preparación PCR 2:  
(2 tubos/muestra): 2 minutos

PCR2 : 90 minutos

Mezcla de productos reacción A+B

LIBRERÍA



Visualización de la librería

Purificación

Secuenciación con sistemas Illumina  
(150x2 con oligos nextera)



NGS

REF. PRODUCTO RUO  
(uso exclusivo en investigación)  
OG-P1-24

#### PRODUCTOS RELACIONADOS

PRODUCTO	REFERENCIA
OG-TP53-NB	OG-TP53-NB-24/48
OG-TP53	OG-TP53-24/96
OG-P2	OG-P2-24/96
OG-BC-01 02/03/04	OG-BC-01/02/03/04

CONTACTO:

[www.seqplexing.com](http://www.seqplexing.com)

e-mail: [info@seqplexing.com](mailto:info@seqplexing.com)

Tel: +34 96 35432 63