

HR1 BRCA 1/2 NGS IVD KIT

Navrženo pro PGM ION-TORRENT

KÓD PRODUKTU: PRG-HR1-01

VELIKOST BALENÍ: 16 TEST

Uživatelská příručka

Rev05.2015



Obsah

1. ÚVOD	3
2. ÚČEL POUŽITÍ	3
3. OBSAH KITU	4
4. SKLADOVÁNÍ	5
5. STABILITA PRODUKTU	5
6. PRINCIP TESTU	5
7. NEZBYTNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ KITU	5
8. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE	6
9. PROTOKOL	7
<i>Izolace DNA z FFPE (tkání fixovaných formalínem a zalitých parafínem)</i>	7
<i>Kvantifikace DNA</i>	7
<i>Příprava master mixu PCR</i>	7
<i>Částečné štěpení amplikonů</i>	10
<i>Ligace adaptérů a barcoding</i>	11
<i>Purifikace knihovny</i>	12
<i>Amplifikace knihovny</i>	12
<i>Purifikace amplifikovaných knihoven</i>	13
10. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	14
11. REFERENCE	15

1. ÚVOD

Sada HR1 BRCA1/2 umožňuje identifikaci mutací v genech BRCA1 a BRCA2. Tento test se může využít buď k predikci rizika dědičné rakoviny prsu a vaječnicků nebo k predikci reakce pacienta na konkrétní léky.

Hodnocení rizik dědičné rakoviny prsu a vaječnicků

Rakovina prsu je nejčastější neoplazií u žen. Přibližně 1 z 10 žen v průběhu života onemocní rakovinou prsu. Rakovina vaječnicků je méně častá, postihuje přibližně 1 ze 100 žen. Většinou se rakovina prsu a vaječnicků vyvine bez jakéhokoliv dědičného faktoru, pouze u přibližně 5 % případů koreluje s dědičnými podmínkami. U většiny dědičných případů se mutace vyskytují v genech BRCA1 nebo BRCA2, které korelují se zvýšeným rizikem rakoviny prsu. U mužů koreluje mutace v BRCA2 genu se zvýšeným rizikem rakoviny prsu a v menším rozsahu také rakoviny slinivky a prostaty.

Predikce reakce pacienta na konkrétní léky na rakovinu vaječnicků

Mutace v BRCA1/2 genech se vyskytují přibližně u 20 % rakoviny vaječnicků. Přítomnost mutací BRCA1/2 má jak prediktivní, tak i prognostický význam. Pacienti nemocní rakovinou s mutací BRCA1/2 mají lepší prognózy a možnost být léčeni inhibitory PARP enzymů, jako např. Olaparib. Olaparib byl schválen Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA) pro léčbu rakoviny vaječnicků ve spojení s přítomností mutací v genech BRCA1/2.

Některé mutace v genech BRCA1/2 jsou přítomny pouze v rakovinných buňkách (somatické mutace), zatímco jiné neoplazie se mohou objevit u žen nosících dědičné mutace (germinální mutace) v genech BRCA1 nebo BRCA2.

Molekulární testy na analýzu mutací v genech BRCA1/2 (na tkáních nebo buňkách postižených neoplazií) umožňují identifikaci somatických mutací (mutací přítomných pouze v buňkách postižených neoplazií) a následně možnost provést léčbu Olaparibem. U dědičných (germinálních) mutací, které se vyznačují konstituční DNA, je třeba otestovat DNA na krevních vzorcích.

2. ÚČEL POUŽITÍ

Kit HR1 BRCA 1/2 NGS umožňuje diagnostickou a sekvenční analýzu genů BRCA1, BRCA2 a TP53 prostřednictvím molekulárního protokolu na bázi technologií sekvenace nové generace (Next Generation Sequencing - NGS). Činidla v soupravě jsou připravena k použití a umožňují vytváření knihovny fragmentů DNA určených pro PGM Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific).

Metody NGS analýzy naleznete v příručkách dodávaných s instrumentací.

PGM Ion Torrent:

Ion Ampliseq Library 2.0

Ion Xpress Barcodes

Ion OneTouch 200 Template Kit v2DL

Ion PGM Template OT2 200Kit

Ion PGM Sequencing 200 Kit

Ion PGM Sequencing200 Kit v2

3. OBSAH KITU

KIT HR1 BRCA1/2 NGS IVD obsahuje všechna činidla (tabulka 1) potřebná pro cílené obohacení a výrobu specifické obousměrné knihovny ampliconů určených pro analýzu sekvenace nové generace za použití PGM Ion Torrent.

Zkumavka	Popis	Objem
Pool 1	Směs oligonukleotidů 1	165 µl
Pool 2	Směs oligonukleotidů 2	165 µl
Pool 3	Směs oligonukleotidů 3	165 µl
Taq	High Fidelity Taq Polymerase	20 µl
Pufr	Reakční pufr	250 µl
dNTP	Směs dNTP 10 mM	80 µl

Tabulka 1: Obsah kitu HR1 BRCA 1/2

4. SKLADOVÁNÍ

Všechna činidla dodávaná s našimi sadami jsou připravena k použití a měla by být skladována při -20 °C.

5. STABILITA PRODUKTU

Všechna činidla dodávaná s kitem EGFR si budou udržovat vysokou kvalitu až do vypršení data použitelnosti, které je označené na každé lahvičce činidla a na vnější nádobě/obalu.

6. PRINCIP TESTU

Tento test je založen na reakci PCR (polymerázová řetězová reakce). Reakční činidla, která jsou součástí sady HR1 BRCA1/2 umožňují pomocí PCR reakcí amplifikaci specifických DNA sekvencí genů BRCA1 a BRCA2. Specifické mutace těchto genů jsou klíčové a určují reakci pacientů na biologické léky. DNA může být izolována z rakovinných tkání zalitých parafínem (FFPE), vzorků z aspirace tenkou jehlou (FNA) nebo čerstvé zmrazené tkáně.

7. NEZBYTNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ

KVANTIFIKACE DNA:

- Mikropipety 2-20 µl, 20-200 µl nebo 100-1000 µl a špičky
- Fluorimetr Qubit® 2.0 (Invitrogen kód Q32866), nebo fluorimetr Qubit® 3.0 (Invitrogen kód Q33216)
- Testovací zkumavky Qubit (kat. č. Q32856)
- Testovací sada Qubit® dsDNA HS (Invitrogen, kód Q32851)
- Vortex
- Jednorázové rukavice

AMPLIFIKACE DNA A KNIHOVEN

- Sada mikropipet pro PCR se špičkami
- Termocykler ABI9700 (Applied Biosystems)
- Zkumavka a víčka nebo 96-jamková destičku, dle potřeby, bez DNáz a RNáz
- Voda bez nukleáz
- Jednorázové rukavice

KVALIFIKACE A KVANTIFIKACE KNIHOVEN:

- Systém Agilent 2100 Bioanalyzer (důrazně doporučeno) se sadou činidel DNA High Sensitivity (kat. č. 5067-4626)

PURIFIKACE DNA

Purifikace sadou Agencourt AMPure XP vyžaduje následující nástroje a činidla:

- Sada Agencourt AMPure XP (Beckman counter, kód A63880)
- Ohřívač / suchý inkubátor (40° C)
- 1,5ml trubcový magnetický separátor nebo magnetický separátor kompatibilní s 96-jamkovou destičkou
- Čerstvý 70% etanol
- Vícekanálová pipeta (doporučeno)
- Buď voda, TRIS-acetát (10 mM pH 8,0) nebo TE pufr (10 mM Tris-acetát pH 8,0, 1 mM EDTA) na eluci DNA

ŠTĚPENÍ KNIHOVEN A LIGACE ADAPTÉRŮ

- Ion Ampliseq LIB 2.0-384LV (Life Technologies kód 448044)
- BARKÓDY Ion Xpress 1-16 (Life Technologies kód 4471250)
- Sada mikropipet pro PCR se špičkami
- Termocykler ABI9700 (Applied Biosystems)
- Zkumavka a víčka nebo 96-jamková destičku, dle potřeby, bez DNáz a RNáz
- Voda bez nukleáz
- Jednorázové rukavice

8. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE

- Biologické vzorky a všechna činidla sady EGFR by měly být používány v místnostech řádně vybavených, čistých a ve kterých se nenacházejí potenciální kontaminanty. Doporučujeme pracovní plochy často čistit roztokem obsahujícím chlornan sodný 5 %.
- Vždy používejte ochranné pomůcky, jako je laboratorní plášť, rukavice a ochranné brýle, během všech fází popsanych v protokolu.
- Aby se zabránilo kontaminaci činidel, doporučujeme používat zkumavky a špičky bez DNáz/RNáz, věnujte zvláště pozornost tomu, aby všechny nástroje byly čisté a bez kontaminantů.
- Doporučujeme dodržovat jednosměrný pracovní postup od počáteční fáze izolace DNA v návaznosti na přípravné fáze PCR, fáze amplifikace a post-amplifikace, aby byly pracovní prostory pro různé fáze oddělené, a používat pro každou fázi postupu specializované laboratorní pláště, mikropipety, zkumavky a víčka.
- Použitá činidla a biologické vzorky musí být zlikvidovány v souladu s právními postupy.

9. PROTOKOL

Izolace DNA ze vzorků FFPE (vzorků tkání fixovaných formalínem a zalitých parafínem)

Provedte extrakci DNA z FFPE bloků. Indikace by měly vést k vyššímu množství, než je potřebné, aby se umožnilo další šetření.

Oddělte řezů tkáně FFPE o tloušťce přibližně 4 µm.

Přejděte k obohacení tkání, čímž se dosáhne buněčnosti nad 50 %

Vyextrahujte DNA pomocí QIAamp FFPE Tissue Kit (Qiagen) podle pokynů výrobce.

Kvantifikace DNA

Je možné provést kvantifikaci DNA, avšak získaná data mohou být ovlivněna nadměrnou fixací formalínu, a tudíž nepřesná.

Stanovte počáteční koncentraci DNA pomocí Qubit dsDNA HS Assay podle pokynů výrobce.

Použijte 10 ng DNA pro každou ze tří PCR reakcí potřebných pro každý vzorek.

Příprava master mixu PCR

Připravte 3 zkumavky pro každý vzorek, poté smíchejte dodaná činidla s DNA vzorkem, který má být otestován podle níže uvedené tabulky:

Počet x 1 vzorek	HR1 pool 1	HR1 pool 2	HR1 pool 3
Reakční pufr	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTP 10 mM	1 µl	1 µl	1 µl
Taq polymeráza	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
DNA (20 ng/zkumavka)	X	X	X
Primer pool 1	10 µl	-	-
Primer pool 2	-	10 µl	-
Primer pool 3	-	-	10 µl
H ₂ O	11,25 µl - X	11,25 µl - X	11,25 µl - X
CELKEM	25 µl	25 µl	25 µl

Tabulka 2: množství činidel pro každou reakci cíleného obohacení

* Účinnost amplifikačního procesu je silně ovlivněna kvalitou vzorku použité DNA. V případě použití částečně degradovaného nebo fragmentovaného vzorku DNA (tj. FFPE vzorky) je možné zvýšit množství DNA použité v PCR reakcích.

Následující postup se týká přípravy jednoho vzorku DNA o koncentraci 20 ng/μl, a má indikovat doporučený pracovní postup. Doporučuje se dodržovat následující postup, aby se minimalizovaly chyby a snížil počet operací potřebných k přípravě PCR směsi.

Vypočtený objem pro 1 vzorek při 10 ng/μl

Počet x 1 vzorek (DNA 20 ng/μl)	HR1 pool 1	HR1 pool 2	HR1 pool 3
Reakční pufr	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl
dNTP 10 mM	1 μl	1 μl	1 μl
Taq polymeráza	0,25 μl	0,25 μl	0,25 μl
DNA (20 ng)	1	1	1
Primer pool 1	10 μl	-	-
Primer pool 2	-	10 μl	-
Primer pool 3	-	-	10 μl
H ₂ O	10,25	10,25	10,25
CELKEM	25 μl	25 μl	25 μl

Tabulka 3: příklad výpočtů objemu pro 1 vzorek při 10 ng/μl

Rozmrazte pufr, dNTP a oligonukleotidové směsi. Zvortexujte a krátce odstředte. Uchovávejte Taq polymerázu zmrazenou (nemíchejte ji).

Připravte počáteční pracovní směs (MIX 1), který obsahuje reakční pufr, dNTP, Taq polymerázu a vodu dle následující tabulky.

Počet x 1 vzorek (DNA 20 ng/μl)	MIX 1
Reakční pufr	7,5 μl
dNTP	3 μl
Taq polymeráza	0,75 μl
H ₂ O	30,75 μl
CELKEM	42 μl

Tabulka 4: Příprava MIX 1

Přesně smíchejte MIX 1 (nevortexujte) a následně rozdělte po 14 µl/zkumavka do 3 PCR zkumavek nebo PCR 96-jamkových destiček.

Rozdělte 10 µl primeru poolu 1, poolu 2 a poolu 3 do každé ze tří předem připravených PCR zkumavek.

Počet x 1 reakce (DNA 20 ng/µl)	HR1 pool 1	HR1 pool 2	HR1 pool 3
MIX 1	14 µl	14 µl	14 µl
Primer pool 1	10 µl	-	-
Primer pool 2	-	10 µl	-
Primer pool 3	-	-	10 µl
CELKEM	24 µl	24 µl	24 µl

Tabulka 5: Kombinace různých primerových poolů s MIXem 1

9.3.3 Přejděte do jiných pracovních prostor, následně přidejte 1 µl DNA do každé ze 3 PCR zkumavek. Vzorke krátce odstředte.

	HR1 pool 1	HR1 pool 2	HR1 pool 3
MIX 1 + primer	24 µl	24 µl	24 µl
DNA	1 µl	1 µl	1 µl
CELKEM	25 µl	25 µl	25 µl

Tabulka 6: Kombinace různých primerových poolů na MIXem 1 + primerem a DNA

NB: Během všech postupů udržujte směsi zmražené, pokud je nepoužíváte. Pokud pracujete s 96-jamkovými destičkami, použijte správné chladičí bloky. Před zahájením PCR reakce uchovávejte zkumavky na ledu.

Umístěte PCR zkumavky do PCR přístroje (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystem) a poté spusťte program dle následujících teplotních profilů. Nastavte konečný objem na 25 µl a ramping teplotních přechodů na "STD" nebo "MAX" (v závislosti na modelu AB9700)

teplota	vteřiny	počet cyklů
94 °C	120	1
94 °C	30	20
60 °C	120	
65 °C	120	
10 °C	HOLD	1

Tabulka 7: Teplotní profil PCR

Na konci PCR reakcí spojte 3 PCR zkumavky do zkumavky jedné (celkem 75 µl)

Vzorky je možné skladovat 24 hodin při teplotě 4 °C, nebo delší dobu při -20 °C.

Částečné štěpení amplikonů

Přidejte 2 µl FuPa (hnědé víčko AmpliSeq Library Preparation kit Life Technologies kód 4480442) do všech vzorků. Konečný objem je 77 µl.

Umístěte PCR zkumavky do PCR přístroje a poté spusťte program dle následujících teplotních profilů.

teplota	minuty
50 °C	10
55 °C	10
60 °C	20
10 °C	nechte běžet* (až 1 hodinu)

Tabulka 8: Teplotní profil pro štěpení amplikonů

Ligace adaptérů a barcoding

Pro každý zvolený barkód připravte směs Ion P1 Adapter a Ion Xpress Barcode (Life Technologies kód 4471250) v konečném poměru 1:4 pro každý adaptér dle následující tabulky:

Příklad reakční směsi pro 4 reakce	
Ion P1 Adapter	2 μ l
Ion Xpress Barcode X	2 μ l
H₂O	4 μ l
CELKEM	8 μl

Tabulka 9: Adaptéry a poměr barkódu 1:4

Přidejte ke každému vzorku následující činidla. Switch solution a adaptéry mohou být smíchány předem.

Switch solution (žluté víčko)	4 μ l
zředěné adaptéry a barkódy	2 μ l
Ligáza	2 μ l
Celkový objem (včetně 77 μl rozředěného produktu)	85 μl

Tabulka 10: Ligační směs

Krátce odstřed'ujte.

Umístěte PCR zkumavky do PCR termocykleru a poté spusťte program dle následujících teplotních profilů.

teplota	minuty
22 °C	30
72 °C	10
10 °C	nechte běžet* (až 1 hodinu)

Tabulka 11: Teplotní profil ligace

Purifikace knihovny

Rozdělte 70 µl Agencourt® AMPure® do nových 1,5ml zkumavek LowBind a pipetováním nahoru a dolů (pětkrát) přidejte knihovnu získanou smícháním, čímž homogenizujete rozptýlené kuličky s DNA. V této fázi váže vysoká molekulová hmotnost DNA kuličky, zatímco amplikony a primery zůstávají v roztoku. Supernatant se neodstraňuje.

Pět minut inkubujte při pokojové teplotě.

Umístěte zkumavky na magnetický stojan a inkubujte 2 minuty, nebo dokud se roztok nejeví čirý. Odeberte supernatant, aniž byste se dotkli pelety.

Přidejte 200 µl etanolu 70 % a dvakrát otočte zkumavky, abyste opláchli kuličky. Odstraňte supernatant, aniž byste se dotkli pelety.

Opakujte fázi oplachování.

Odstraňte všechnu etanol. Ponechte zkumavky 5 minut na magnetickém stojanu, čímž se kuličky na vzduchu usuší. Nepřesušujte.

Odeberte zkumavky z magnetického stojanu a přidejte k peletě 45 µl DNase/DNase free PCR H₂O.

Alespoň pětkrát promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

Alespoň 5 minut inkubujte při pokojové teplotě.

Umístěte zkumavky na 2 minuty na magnetický stojan a poté (anož byste se dotkli pelety) odeberte 40 µl supernatantu obsahujícího amplikony.

Amplifikace knihovny

Pro každý vzorek připravte reakční směs dle rozpisu v následující tabulce:

Quantity x 1 sample	MIX 1
Reaction buffer	5 µl
dNTPs	1 µl
Primer Mix Ampliseq (white cap)	2 µl
Taq Polimerase	0,25 µl
H ₂ O nuclease free	1,75 µl
Library in H ₂ O nuclease free	40 µl
TOTAL	50 µl

Umístěte PCR zkumavky do PCR přístroje a poté spusťte program dle následujících teplotních profilů:

10 teplota	vteřiny	počet cyklů
94 °C	120	1
94 °C	30	10
60 °C	60	
65 °C	60	
10 °C	HOLD	1

Tabulka 12: Teplotní profil amplifikace knihovny

Purifikace amplifikovaných knihoven

Rozdělte 25 µl (0,5X objemu vzorku) Agencourt® AMPure® do nových 1,5ml zkumavek LowBind a pipetováním nahoru a dolů (pětkrát) přidejte knihovnu získanou smícháním, čímž homogenizujete rozptýlené kuličky s DNA. V této fázi váže vysoká molekulová hmotnost DNA kuličky, zatímco amplikony a primery zůstávají v roztoku. Supernatant se neodstraňuje.

Pět minut inkubujte při pokojové teplotě.

Umístěte zkumavky na magnetický stojan a inkubujte 2 minuty, nebo dokud se roztok nejeví čirý. Přelijte supernatant do nové 1,5ml zkumavky obsahující 60 µl (1,2X objem vzorku) Agencourt® AMPure®, aniž byste se dotkli sraženiny.

Pět minut inkubujte při pokojové teplotě.

Umístěte zkumavky na magnetický stojan a inkubujte 2 minuty, nebo dokud se roztok nejeví čirý.

Přidejte 200 µl etanolu 70 % a dvakrát otočte zkumavky, abyste opláchli kuličky. Odstraňte supernatant, aniž byste se dotkli sraženiny.

Opakujte fázi oplachování.

Odstraňte všechny etanol. Ponechte zkumavky 5 minut na magnetickém stojanu, čímž se kuličky na vzduchu usuší. Nepřesušujte.

Přidejte 50 µl Low TE k peletě a odeberte zkumavky z magnetického stojanu.

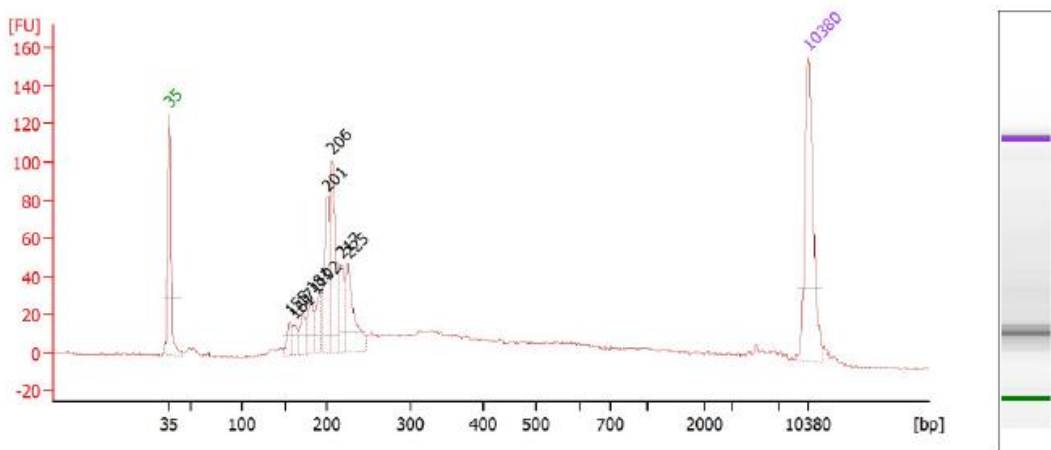
Alespoň pětkrát promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

Tři minuty inkubujte při pokojové teplotě.

Umístěte zkumavky na 2 minuty na magnetický stojan a přelijte purifikovanou knihovnu do nové 0,5ml zkumavky.

Kontrola kvality a kvantity amplifikovaných knihoven

Knihovny získané tímto postupem musí být překontrolované a kvantifikované systémem Bioanalyzer 2100 za použití DNA High Sensitivity kitu. Při kvantifikaci uvažujte všechny amplifikované píky v rozmezí 100 – 250 bp.



Overall Results for sample 3 :

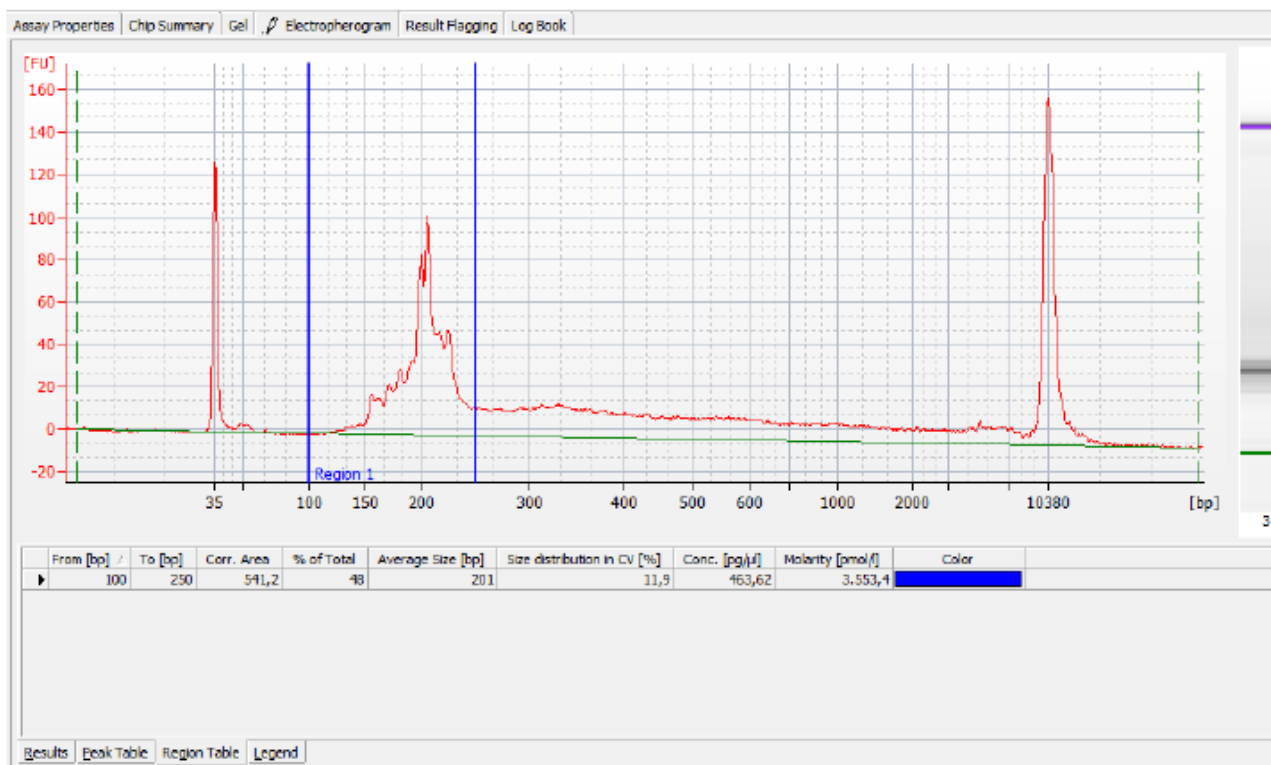
Number of peaks found: 9 Noise: 0,4

Peak table for sample 3 :

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	
2	155	18,38	179,3	Lower Marker
3	161	16,31	153,8	
4	171	24,98	221,5	
5	181	34,72	290,5	
6	192	30,39	240,0	
7	201	75,78	572,2	
8	206	98,55	724,6	
9	217	42,81	299,1	
10	225	67,56	454,4	
11	10.380	75,00	10,9	Upper Marker

Obrázek 1: Příklad správně amplifikované a přečištěné knihovny

Pro kvantifikaci knihovny rovněž použijte system Bioanalyzer 2100. Při kvantifikaci uvažujte všechny amplifikované píky v rozmezí 100 – 250 bp.



Obrázek 2: Příklad správně přečištěné knihovny

Podle výsledků kvantifikace naředte všechny knihovny na stejnou molaritu a poté přeneste stejný objem z každé naředěné knihovny do nové zkumavky a smíchejte, abyste získali ekvimolární směs všech vytvořených knihoven. Doporučujeme vytvořit směs knihoven o nejvyšší možné koncentraci a postupně tuto směs naředit na finální koncentraci **6pM** potřebnou pro provedení emPCR. Směsnou knihovnu použijte pro provedení emPCR a nabohacení dle protokolů přístrojového vybavení Ion Torrent.

HR1 BRCA1/2	
Amplifikované oblasti	Kódující sekvence + 50 bp intron-exonových spojů
Počet amplifikovaných basí	28 174
Průměrná délka amplikonu	165 bp
Počet používaných směsí oligonukleotidů	3
Potřebné vstupní množství DNA	30 ng
Počet amplikonů	253
Specifita (n=47)	100%
Průměrné pokrytí	3507
% bp pokrytých $\geq 10x$	100%
% bp pokrytých $\geq 30x$	99,9%
% bp pokrytých $\geq 100x$	99,6%
% bp pokrytých $\geq 500x$	96,5%
% bp odečitatelných dle Torrent varian caller	99,1%

Tabulka 13: Základní funkční charakteristiky kitu

10. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

PROBLÉM	MOŽNÁ PŘÍČINA	Doporučení
Absence očekávaných fragmentů na agarózovém gelu	Chybně naprogramovaný termocykler	Zkontrolujte teplotní profil a kalibraci a reakci opakujte
	Chyba při přípravě Master Mixu	Zkontrolujte složky PCR směsi a reakci opakujte
	Degradace reagensů	Zkontrolujte datum expirace a podmínky uskladnění sady
	Přítomnost inhibitorů	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu extrahované DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci.
	Nedostatečná kvantita DNA	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci
Přítomnost smíru na agarósovém gelu	Degradace templátové DNA	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci DNA
Přítomnost fragmentů s nízkou molekulovou hmotností	Zbytky primerů a/nebo zhoršení kvality adaptérů, výskyt dimerů oligonukleotidů, atd.	Eliminujte fragmenty s nízkou molekulovou hmotností za použití kalibračních postupů pomocí AMPure XP Beads

11. REFERENCE

1. Science 24 October 2003:Sv. 302 č. 5645 str.
2. Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian cancer, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. PNAS 2011;108:18032, 2011.
3. Ford D, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet. 1998 Mar;62(3):676-89.
4. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. Clin Genet 82:105, 2012.