

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN Lung Cancer Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0002

Evropská unie:



Ostatní státy:

Pouze pro výzkumné účely



**BioVendor
R&D®**



BioVendor – Laboratorní medicína s.r.o.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com

1.	POUŽITÍ	4
2.	SKLADOVÁNÍ	5
3.	ÚVOD	6
4.	PRINCIP STANOVENÍ	7
5.	UPOZORNĚNÍ	7
6.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	8
7.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	9
8.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	10
9.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	11
10.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	12
11.	POSTUP STANOVENÍ	13
12.	VYHODNOCENÍ	19
13.	LIMITACE SOUPRAVY	21
14.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	21
15.	ČASTO KLADENÉ DOTAZY	22
16.	REFERENCE	23
17.	DALŠÍ INFORMACE	23
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	24

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.004.A	CZE.005.A
Přidána kapitola 17.	
CZE.005.A	CZE.005.B
Změna právní formy společnosti.	

Vzor

1. POUŽITÍ

RDNGS0002 BioVendor fastGEN Lung Cancer Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genů *EGFR* (exony 18, 19, 20, 21) rychlým masivně paralelním sekvenováním (NGS) na přístroji Illumina®. Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA modul fastGEN dostupného online.

Informace o mutačním statusu *EGFR* genů je vyžadována pro indikaci správné terapie metastazujících nádorů a případně pro hodnocení prognózy onemocnění.

Použité zkratky

Ct	číslo cyklu (cycle threshold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
<i>EGFR</i>	gen pro receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/asymmetrical cyanine dye
FFPE	vzorky fixované formalinem a zalité v parafinu (formalin-fixed, paraffin-embedded)
LoD	limit detekce (limit of detection)
NC	negativní kontrola (negative control)
NGS	masivně paralelní sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PC	pozitivní kontrola (positive control)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)

Základní charakteristika

- **Evropská unie: použití pro *in vitro* diagnostiku**
- **Ostatní státy: pouze pro výzkumné účely.**
- Celková doba přípravy sekvenační knihovny je kratší než 3 hodiny a zahrnuje méně než **30 minut laboratorních operací.**
- Technologie je založena na rychlé a robustní jednokrokové přípravě sekvenační knihovny za účelem genotypizace onkomarkeru *EGFR*.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy**, včetně indexů, určených k přímému použití a také **sekvenační primery**.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN Lung Cancer Kit vyžaduje **pouze přidání izolované DNA** ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru
- Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je DNA izolovaná z nádorů či cirkulující nádorová DNA izolovaná z plazmy. Postup je vhodný i pro DNA izolovanou ze vzorků tkáně z FFPE bločků.
- Kapacita soupravy je 16 reakcí/vzorků pro *EGFR* s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA, modul fastGEN dostupného online.

2. SKLADOVÁNÍ

Soupravu skladujte při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za těchto podmínek jsou všechny komponenty stabilní po dobu expirace uvedené na vnějším obalu.

- Souprava fastGEN Lung Cancer Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN Lung Cancer Kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Komponenty soupravy **chráňte před světlem**.
- Omezte opakované zmražení a rozmražení.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

3. ÚVOD

Karcinomy plic patří mezi nejčastěji se vyskytující maligní nádorová onemocnění [1, 2]. Personalizovaná terapie může pro pacienty s různými druhy závažných nádorových onemocnění znamenat velkou naději na prodloužení a zkvalitnění života. Pro efektivní nastavení terapie je nutné rozlišit pacienty, kteří budou mít z léčby benefit, od pacientů, jejichž karcinom je vůči terapii přirozeně rezistentní. Vhodné prediktivní molekulární markery umožňují zvýšit celkovou efektivitu a snížit finanční náklady na terapii [3, 4].

Informace o mutačním statusu genu *EGFR* (exony 18, 19, 20, 21) je vyžadována pro indikaci správné terapie metastazujících plicních karcinomů léčivy gefitinib, erlotinib, afatinib anebo osimertinib na bázi inhibitorů tyrosin kináz [3–6].

V současné době jsou k dispozici metody genotypizace založené na sekvenování technologií NGS, které nevyžadují specifické sondy nebo primerové páry pro každou přípustnou variantu mutace, což snižuje riziko falešně negativních výsledků.

Základem NGS genotypizace je příprava vhodného dvouvláknového DNA konstruktů (tzv. sekvenační knihovny), který musí obsahovat:

- cílovou sekvenci pro účely genotypizace (úsek DNA)
- adaptérovou sekvenci pro nasedání sekvenačních primerů
- indexovou sekvenci, která je pro vzorek v daném běhu unikátní, sloužící ke ztotožnění získaných výsledků s odpovídajícím vzorkem DNA (pacientem) a umožňuje tak paralelní sekvenování více vzorků (typicky více než deset) v jednom běhu
- sekvenci pro navázání DNA konstruktů na povrch sekvenační komůrky

4. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN Lung Cancer Kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření mutačního statusu klinicky relevantních onkomarkerů *EGFR* pomocí NGS. Vstupním materiálem je izolovaná DNA. Princip stanovení využívá NGS sekvenování krátkých amplikonů získaných pomocí jediné polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery, kdy se provede amplifikace úseků o délce do 150 párů bází a následné sekvenování o vysokém pokrytí. Použití krátkých amplikonů zvyšuje amplifikovatelnost DNA a diagnostickou výtěžnost. Master Mixy dodávané ve formátu k přímému použití umožňují úsporu celkového času na vyšetření a snížení rizika chyby. Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA, modul fastGEN, dostupného online.

Příprava sekvenační knihovny pomocí soupravy fastGEN Lung Cancer Kit vyžaduje pouze přidání izolované DNA ke konkrétnímu Master Mixu a amplifikaci pomocí Real-Time PCR termocyklu.

K vyhodnocení sekvenačních dat je doporučen software GENOVESA, modul fastGEN, který je součástí komplexního řešení.

5. UPOZORNĚNÍ

- **Pouze pro profesionální použití.**
- Komponenty soupravy fastGEN Lung Cancer Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN Lung Cancer Kit je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno dodržovat standardní bezpečnostní opatření.
- Nepijte, nejezte a nekuřte v prostoru, kde se pracuje biologickým materiálem.

6. TECHNICKÁ DOPORUČENÍ

- Souprava je určena pro profesionální použití vyškolenými pracovníky v adekvátním laboratorním prostředí.
- Před a po každém testu musí být pracovní prostředí dekontaminováno vhodnými prostředky odstraňujícími RNázy, DNázy i standardními dezinfekčními prostředky. Práce v nevhodném prostředí může vést ke kontaminaci komponent souprav.
- Souprava fastGEN Lung Cancer Kit je určena pro 16 reakcí na vyšetření mutací v genu *EGFR*.
- FastGEN Lung Cancer Kit Master Mix je dodáván pro každý vyšetřovaný vzorek v samostatné zkumavce. Nedoporučujeme alikvotovat a opakovaně rozmrazovat, vícenásobné rozmražení může negativně ovlivnit kvalitu testu.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazujte těsně před použitím. Minimalizujte dobu, kdy jsou reagenty při běžné laboratorní teplotě. Doporučujeme použití chladících stojánků.
- Před použitím reagenty promíchejte jemným vortexováním a krátkou centrifugací.
- Přípravu qPCR a post-amplifikační kroky provádějte v oddělených laboratorních prostorech.
- Zabraňte kontaminaci vzorků a reagentů. Z tohoto důvodu používejte pro každý vzorek a reagenty špičky na jedno použití.
- Nezaměňujte reagenty s odlišnými čísly šarže.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

7. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN Lung Cancer Kit** je dodávána ve formátu k přímému použití k provedení 16 reakcí pro gen *EGFR* (Tabulka č. 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** pro *EGFR*.

Složení soupravy fastGEN Lung Cancer Kit	Sekvence indexů	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
Lung Cancer Kit Master Mix i701	TAAGGCGA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i702	CGTACTAG	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i703	AGGCAGAA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i704	TCCTGAGC	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i705	GGACTCCT	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i706	TAGGCATG	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i707	CTCTCTAC	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i710	CGAGGCTG	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i711	AAGAGGCA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i712	GTAGAGGA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i714	GCTCATGA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i715	ATCTCAGG	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i716	ACTCGCTA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i718	GGAGCTAC	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i719	GCGTAGTA	18	1	přímé použití
Lung Cancer Kit Master Mix i720	CGGAGCCT	18	1	přímé použití
R1SP		12	1	k ředění
R2SP Lung Cancer		20	1	k ředění
ISP Lung Cancer		20	1	k ředění

Tabulka č. 1 Složení soupravy fastGEN Lung Cancer Kit.

8. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

Chemikálie

- Vyšetřovaná DNA (standardní koncentrace nejméně 10–200 ng/μl dle spektrofotometru, resp. 1 ng/μl dle fluorimetru Qubit HS assay; méně koncentrovanou DNA je možné vyšetřit ve speciálním režimu, viz Tabulka č. 2)
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu *EGFR* (vhodný jako **pozitivní kontrola**)
- Voda pro molekulární biologii (Nuclease Free Water, vhodná jako **negativní kontrola**)
- Illumina sekvenační kit
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies)
- NaOH (p.a.)
- Tween 20
- Purifikační kit pro DNA pool
- Komerčně dostupné roztoky pro dekontaminaci povrchů

Materiál

- Zkumavky 0,2 ml a zkumavky 1,5–2 ml vhodné pro práci s nukleovými kyselinami (RNase + DNase free, low binding nucleic acid tubes)
- PCR zkumavky/stripy/destičky dle použitého Real-Time PCR termocykleru (vhodné pro práci s nukleovými kyselinami)
- Adhezivní PCR fólie
- Stojánky na zkumavky
- Chladicí bločky/lednice/mrazák/box s ledem pro vychlazení zkumavek
- Jednorázové utěrky na optická zařízení
- Jednorázové špičky s filtrem
- Ochranné pomůcky (rukavice, oděv)

Přístroje

- Automatické pipety pro objemy 0,2–1 000 μl
- Real-Time-PCR termocykler
- Flowbox/PCR box
- Fluorimetr
- Vortex, combi-spin (centrifuga a vortex), centrifugy
- Sekvenátor Illumina®, Inc.

9. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Připravte odpovídající počet zkumavek s Master Mixy potřebnými pro plánovaný test.

Nepoužívejte komponenty po uplynutí doby expirace vyznačené na obalu.

Reagencie jsou dodávány ve formě k přímému použití nebo k ředění.

fastGEN Lung Cancer Kit: Master Mix

Pro genotypizaci genu *EGFR* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní množství zkumavek Lung Cancer Kit Master Mix a uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

Sekvenační primery

Před denaturací sekvenační knihovny nechte rozmrazit a uchovejte je v chladu do doby těsně před použitím:

- 1 zkumavku: R1SP
- 1 zkumavku: R2SP Lung Cancer
- 1 zkumavku: ISP Lung Cancer

Doporučení:

Do každého běhu testování pomocí fastGEN Lung Cancer Kitu je doporučeno přidávat pozitivní kontrolu (PC; standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů, není dodáván se soupravou) a negativní kontrolu (NC), pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. Při nedodržení tohoto doporučení nelze vyloučit falešně pozitivní či negativní výsledky.

S pozitivní kontrolou manipulujte s opatrností a pipetujte jako poslední součást reakce.

Při nevhodné manipulaci může dojít ke kontaminaci testu a falešně pozitivním výsledkům.

Při podezření na kontaminaci test opakujte.

10. PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Jako vstupní vzorek použijte DNA izolovanou z nádorové tkáně, z plazmy s obsahem cirkulující nádorové DNA nebo DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích.
- Stanovte vhodné ředění na základě koncentrace vstupní DNA dle Tabulky č. 2.
- Správného množství vstupní DNA v doporučeném rozsahu dosáhnete dle následujících postupů:
 - A) Vzorky o **vysoké koncentraci DNA** ředíte 5x (1 µl DNA + 4 µl H₂O).
 - B) Vzorky o **standardní koncentraci DNA** neředíte.
 - C) Vzorky o **velmi nízké koncentraci DNA** neředíte a zahrňte je do analýzy v duplikátu (pipetujte 5 µl DNA do zkumavek s dvěma různými Master Mixy).
- Do jedné reakce pipetujte vždy **5 µl DNA** vzorku připraveného dle Tabulky č. 2.
- Vzorek naředěný na vhodnou koncentraci je **připraven k analýze**. Pokračujte dle kapitoly 11. Postup stanovení.

	Koncentrace Nanodrop	Koncentrace Qubit HS	Ředění	Postup ředění
A	>200 ng/µl	>20 ng/µl	5 x	1 µl DNA + 4 µl H ₂ O
B	10–200 ng/µl	1–20 ng/µl	bez ředění	5 µl DNA
C	<10 ng/µl	<1 ng/µl	bez ředění	5 µl DNA v duplikátu

Tabulka č. 2 Stanovení vhodného ředění DNA do PCR reakce.

Doporučení:

Pozitivní kontrola (PC)

Není součástí soupravy. Kontrolní analýza PC je doporučována v rámci každého běhu testování pro zhodnocení správné přípravy reakcí.

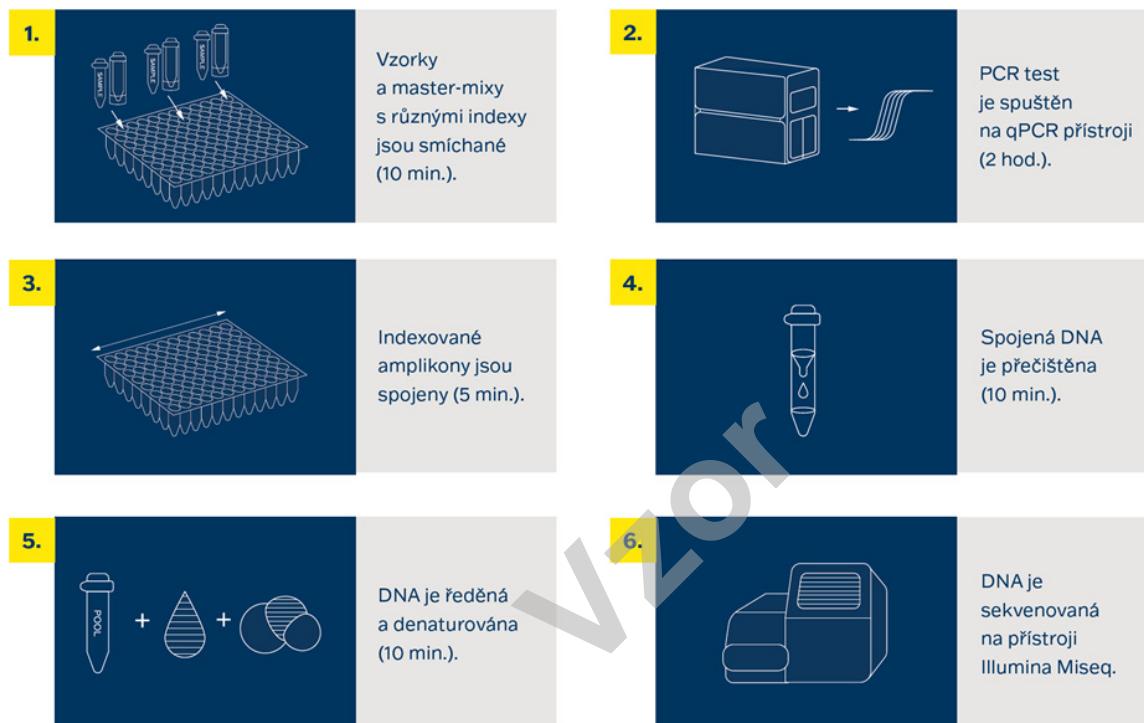
PC připravte obdobným ředěním jako vyšetřované vzorky DNA.

Upozornění: Zkumavky s pozitivní kontrolou nikdy neotvírejte během přípravy testu, vždy je pipetujte jako poslední součást reakce. Při nevhodné manipulaci může dojít ke kontaminaci testu a falešně pozitivním výsledkům. Při podezření na kontaminaci test opakujte.

11. POSTUP STANOVENÍ

Technologie NGS umožňuje sekvenovat všechny požadované úseky DNA se sekvenačním pokrytím v řádu tisíců čtení pro každý vzorek. Metoda je proto vysoce citlivá a dokáže odhalit somatickou mutaci ve frekvenci od 1 %, případně od 5 %.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat 16 vzorků pro genotypizaci genu *EGFR* v jednom sekvenačním běhu.



Obrázek č. 1: Schéma postupu genotypizace pomocí soupravy fastGEN.

11.1 Příprava DNA knihovny

11.1.1 Příprava vyšetřované DNA

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Vzorky si připravte podle svého pracovního rozpisu.
- DNA vzorky krátce vortexujte a centrifugujte.
- Do PCR destičky anebo stripu pipetujte **5 μ l DNA o vhodné koncentraci** (viz kapitola 10).
- Doporučení:
 - Zahrňte mezi skupinu vyšetřovaných vzorků také pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrolu.
 - Pipetujte **5 μ l DNA pozitivní kontroly o vhodné koncentraci** (viz kapitola 10).
 - Pipetujte **5 μ l vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu.

11.1.2 Příprava Master Mixů

Pracujte ve vhodném PCR boxu v pre-PCR místnosti.

- Označte si PCR desku nebo strip.
- Po rozmražení Master Mixy krátce vortexujte a centrifugujte.
- Ke každému vzorku nebo kontrole přidejte **15 μ l Master Mixu**.
- Celkový objem PCR reakce je **20 μ l**.
- V jedné pozici můžete použít jenom **jeden** druh Master Mixu.
- Maximální možný počet souběžně vyšetřovaných vzorků, včetně kontrol, je 16.
- Jednotlivé Master Mixy otvírejte postupně a vždy těsně před přidáním do reakce, poté ihned uzavřete. Zabraňte současnému otevírání více Master Mixů, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci.
- Zalepte destičku lepicí PCR fólií nebo uzavřete mikrozkušavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280x g).

11.1.3 qPCR

Na Real-Time PCR termocykleru nastavte amplifikační program dle Tabulky č. 3.

Krok	Čas	Teplota	
denaturace	2 min	95 °C	
amplifikační cyklus	15 s	95 °C	40 cyklů
	30 s	62 °C	
	30 s	72 °C*	
finální elongace	5 min	72 °C	
melting		60 °C → 95 °C	

*čtení signálu v kanálu FAM/SYBR

Tabulka č. 3: Program qPCR amplifikace.

- Zadejte identifikaci vzorků do ovládacího programu Real-Time PCR termocykleru.
- Spustěte nastavený amplifikační program se vzorky.
- Exportujte qPCR data a proveďte kontrolu amplifikace. Hodnoty Ct uložte pro případnou kontrolu.
- Produkty PCR uchovejte pro další použití při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování je uchovejte při -20 °C.

11.2 Příprava sekvenátoru

- Doporučujeme dělat tento krok v dostatečném předstihu.
- Před použitím sekvenátoru, nejlépe v době, kdy probíhá qPCR, sekvenátor promyjte (tzv. “maintenance wash”) a rozmrazte sekvenační kazetu.

11.3 Spojení ampliconů v DNA pool, purifikace a kvantifikace

Celý proces přípravy knihovny provádějte v post-PCR místnosti ve vhodném boxu a **po celou dobu, vyjma denaturace, udržujte amplikony a DNA pool na ledu.**

11.3.1 Spojení ampliconů v DNA pool

- Po ukončení qPCR amplifikace krátce stočte zkumavky s amplikony.
- Pro vytvoření společné knihovny pro genotypizaci genu ***EGFR***:
 - Smíchejte jednotlivé amplikony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
Příklad: Při počtu 16 vzorků smíchejte jednotlivé amplikony pro v množství 3 µl PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 48 ul.
 - Finální objem DNA poolu stanovte dle používaného kitu pro purifikaci DNA poolu.
Doporučení: V případě, že vzorek vykazuje hodnotu Ct > 31 přidejte dvojnásobek, ev. pro Ct > 34 trojnásobek objemu ampliconu do DNA poolu.
- Pro purifikaci přeneste DNA pool do nové 1,5 ml zkumavky.
- Původní PCR destičku/stripy s amplikony uchovejte zmražené pro případné opakování purifikace DNA poolu.

11.3.2 Purifikace DNA poolu

- Pro purifikaci DNA poolu postupujte dle návodu výrobce purifikačního kitu.
- Purifikovaný DNA pool uchovejte dle pokynů výrobce purifikačního kitu.

11.3.3 Kvantifikace DNA poolu

- Fluorimetricky stanovte koncentraci DNA poolu po jeho přečištění.
- DNA pool udržujte na ledu.
- Doporučená koncentrace DNA poolu je cca 40–80 ng/μl; nejnižší akceptovatelná koncentrace je 10 ng/μl.
- Z naměřené hmotnostní koncentrace vypočítejte molaritu DNA poolu podle vzorce:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 155)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- 155 je orientační průměrná velikost molekuly DNA po indexaci v bp
- 660 g/mol je průměrná molární hmotnost jedné báze (1bp)

11.4 Příprava na sekvenaci

11.4.1 Zadání runu

Pro zadání runu využijte vzorový SampleSheet „fastGEN-sample-sheet.xlsx“ na stránkách www.biovendor.com, který editujete (zadejte datum, ID běhu a identifikátory vzorků dle použitých indexů).

11.4.2 Ředění purifikovaného DNA poolu

- Naředte DNA pool (sekvenační knihovnu) vodou pro molekulární biologii na koncentraci **2 nM**.
- Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 1,6 nM – 2,4 nM.
- Ověřte koncentraci naředěného DNA poolu např. metodou Qubit HS. Pro měření použijte minimálně 10 μl naředěného DNA poolu.
- Ředění je možné upravit tak, aby bylo dlouhodobě dosahováno hodnot sekvenační hustoty v rozsahu 1000–1200 kilo-klustrů/mm². V případě neoptimálních densit klustrů (>1200 kilo-klustrů/mm²) je vhodné snížit ředění poolu na 1,8 nM, v případě densit <1000 kilo-klustrů/mm² na 2,2 nM. Pro usnadnění ředění využijte nástroj “fastGEN-pool-dilution.xlsx” dostupný na stránkách www.biovendor.com.
- V opačném případě musí být DNA pool naředěn a proměřen znovu.

11.4.3 Denaturace DNA poolu

- Připravte čerstvý 0,2 M roztok NaOH: 480 µl H₂O + 20 µl 5 M NaOH.
- Smíchejte **10 µl naředěného DNA poolu s 10 µl čerstvě připraveného 0,2 M NaOH (1:1)**. Vždy je nutno použít čerstvý roztok NaOH.
- Společně inkubujte alespoň **5 min při pokojové teplotě**.

11.4.4 Ředění sekvenačních primerů

- Připravte si nové zkumavky pro naředění sekvenačních primerů a v průběhu denaturace naředte sekvenační primery podle následujícího postupu:
 - **Read1 sekvenační primery (R1SP):** 3 µl R1SP + 597 µl HT1
 - **Index sekvenační primery (ISP):** 6 µl ISP Lung Cancer + 594 µl HT1
 - **Read2 sekvenační primery (R2SP):** 6 µl R2SP Lung Cancer + 594 µl HT1

11.4.5 Ředění denaturovaného DNA poolu

Zředte denaturovaný DNA pool vychlazeným roztokem HT1 z lednice na finální koncentraci 10 pM (např. 10 µl DNA pool + 990 µl HT1). **Získaný DNA pool je připraven do sekvenační kazety.** Před aplikací uchovejte DNA pool v lednici.

11.4.6 Příprava sekvenační kazety

- Zkontrolujte, že sekvenační kazeta je dokonale rozmražená a zamíchejte její obsah převrácením (3x).
- Pipetujte 600 µl naředěné 10 pM DNA knihovny a naředěných sekvenačních primerů do sekvenační kazety do pozic 17–20 v uvedeném pořadí:
 - pozice 17: DNA knihovna v HT1
 - pozice 18: naředěný R1SP v HT1
 - pozice 19: naředěný ISP v HT1
 - pozice 20: naředěný R2SP v HT1
- Připravte flowcellu podle pokynů výrobce.
- Spustte sekvenační program (Illumina software). Postupujte podle pokynů výrobce přístroje.

Poznámka: V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, postupujte dle doporučení pro míchání knihoven „fastGEN-pool-mix.docx“, který je dostupný na stránkách www.biovendor.com, případně kontaktujte aplikační podporu.

12. VYHODNOCENÍ

Pro vyhodnocení sekvenačních dat použijte software GENOVESA, modul fastGEN, který je dostupný online na adrese www.biovendor.com.

GENOVESA modul fastGEN

Jedná se o cloudové all-in-one řešení pro analýzu hrubých dat sekvenátorů (FASTQ files) s technickou a aplikační podporou v češtině.

Software umožňuje:

- pokročilou kontrolu kvality sekvenačních dat
- automatické upozornění na regiony s nízkým pokrytím
- jednoduchou filtraci relevantních variant
- měsíční update anotačních databází
- možnost customizace
- ukládat patientská data a varianty do interní databáze
- report na jedno kliknutí

12.1 Genotypizace *EGFR*

Výsledek genotypizace *EGFR* je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byla detekována varianta genu *EGFR* s frekvencí ≥ 1 %:

- mutace v kodonu 719 exonu 18
- delece v exonu 19
- mutace v kodonu 768 exonu 20
- mutace v kodonu 790 exonu 20
- inzerce v exonu 20
- mutace v kodonu 858 exonu 21
- mutace v kodonu 861 exonu 21

V případě pozitivního nálezu mutace v *EGFR* v rozsahu frekvence 1 % až 5 % doporučujeme vyšetření zopakovat nebo verifikovat jinou metodou.

Výsledek genotypizace pro vzorky s velmi nízkou koncentrací DNA (<10 ng/μl; měřeno na přístroji nanospektrofotometr) je považován za validní, pokud se výsledek detekce varianty genu shoduje pro oba replikáty s odlišnými Master Mixy.

12.2 Negativní výsledek

Pokud nejsou dané varianty detekovány, nebo nedosahuje jejich četnost předepsané frekvence, výsledek genotypizace je negativní (bez mutace).

12.3 Interpretace PC a NC

Zahrnutí pozitivní a negativní kontroly pro každý běh testu (skupinu vzorků měřenou současně) je doporučeno pro kontrolu správného provedení přípravy DNA knihovny a vyloučení technických problémů.

Pozitivní kontrola musí splňovat následující kritéria:

- V qPCR amplifikačním kroku přípravy knihovny je detekována s hodnotou minimálně o 3 Ct nižší než NC ($Ct_{PC} + 3 \leq Ct_{NC}$).
- Po vyhodnocení sekvenčních dat vykazuje přítomnost daných variant genu *EGFR* v předepsaných frekvencích.

Negativní kontrola musí splňovat následující kritéria:

- V qPCR amplifikačním kroku přípravy knihovny není detekována, nebo má Ct hodnotu minimálně o 3 Ct vyšší než poslední vzorek/PC.

Pokud PC a NC nesplňuje jeden z parametrů, test neproběhl zcela správně a je nezbytné individuálně zhodnotit dopad na interpretaci dat. Můžete kontaktovat aplikační podporu www.biovendor.com.

Více informací v kapitole 15. Často kladené dotazy.

13. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN Lung Cancer Kit byla validována na vzorcích DNA izolované z nádorové tkáně, z plazmy s obsahem cirkulující nádorové DNA a DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích.
- Výsledek genotypizace je ovlivněn kvalitou vzorku. Správný postup odběru, transportu, izolace DNA a skladování vzorků je pro vyšetření důležitý.
- Výsledky genotypizace by měly být hodnoceny odborným pracovníkem ve zdravotnictví.
- Souprava fastGEN Lung Cancer Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *EGFR* (exony 18, 19, 20, 21) technologií NGS.
- Metoda je určena pro **vyšetření mutačního statusu** onkomarkerů ve vzorcích nádorové tkáně, negativní výsledek nevylučuje mutace pod limitem detekce metody.

Při provedení testu by měly být dodrženy všechny instrukce uvedené v tomto dokumentu. Jejich nedodržení může ovlivnit kvalitu a spolehlivost výsledků.

14. CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY

Vyhodnocením dat v rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN Lung Cancer Kit firmy BioVendor byly stanoveny parametry analytické senzitivity a specifity. Pro každou soupravu byl stanoven limit detekce metody a ověřena křížová reaktivita primerů (*in silico*). Byla testována opakovatelnost a robustnost metody na sérii totožných vzorků ve třech nezávislých experimentech s definovanou změnou podmínek. Diagnostická přesnost (senzitivita a specifita) testu byla stanovena na základě analýzy klinických a referenčních vzorků se známým mutačním statutem. Výsledky stanovení genotypů *EGFR* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech včetně opakování (senzitivita a specifita 100 %).

15. ČASTO Kladené DOTAZY

1. Kolik vzorků lze sekvenovat současně v 1 běhu?

Na jeden vzorek při pročtení alespoň 1 000x a s alelovou frekvencí 1–5 % potřebujeme 50 000 pair end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má 2 mil pair end readů, je při sekvenaci 16 vzorků zaplněn z 50 %.

2. Lze použít i jiný nástroj na analýzu dat?

Ano. Je možné použít i Illumina® Experiment Manager.

3. Jaký typ sekvenátoru je vhodný pro analýzu vzorků připravených kity fastGEN?

Pro sekvenování knihoven připravených pomocí souprav fastGEN jsou vhodné sekvenátory značky Illumina®.

4. Lze kombinovat soupravy na genotypizaci?

Ano, je možné vzájemně kombinovat všechny soupravy z řady fastGEN. V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, postupujte dle doporučení pro míchání knihoven „fastGEN-pool-mix.docx“, který je dostupný na stránkách www.biovendor.com, případně kontaktujte aplikační podporu.

5. Jak přistoupit k hodnocení výsledků v případě, že PC a NC nesplňují daná kritéria?

Příčiny nestandardních výsledků PC a NC mohou být různé. Doporučujeme ověřit kvalitu a správný typ použité PC (musí obsahovat mutace v cílových genech a jejich variantách), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

16. REFERENCE

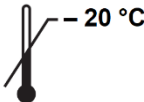
Pro více referencí k tomuto produktu navštivte naše webové stránky www.biovendor.com.

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics 2002, *CA Cancer J Clin* 55, 74–108.
- [2] Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. 2009. Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 59, 366–378.
- [3] Plesec TP and Hunt JL. 2009. KRAS Mutation Testing in Colorectal Cancer. *Med Advances in Anatomic Pathology* 16(4), 196–203.
- [4] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. 2019. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89–103.
- [5] Stintzing S, Heinemann V, Moosmann N, *et al.* 2009. The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and *EGFR* status. *Dtsch Arztebl Int* 106(12), 202–206.
- [6] van Krieken, JHJM, Jung, A, Kirchner, T. *et al.* 2008. *KRAS* mutation testing for predicting response to anti-*EGFR* therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 453, 417–431.

17. DALŠÍ INFORMACE

Jakákoliv závažná událost, k níž došlo v souvislosti s prostředkem, musí být oznámena výrobcí a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém se uživatel nebo pacient nachází.

18. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použít do data
	Horní mez teploty
	Výrobce
 www.biovendor.com	Čtěte elektronický návod k použití
	Obsah postačuje pro 16 testů
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Označení shody CE

Vzor



BioVendor – Laboratorní medicína s.r.o.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com

Datum poslední revize: 13.01.2026



FOLLOW US

BIOVENDOR. GROU P