

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0016

Pouze pro výzkumné účely!



**BioVendor
R&D®**



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com

1.	ÚČEL POUŽITÍ	3
2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	4
3.	SKLADOVÁNÍ	4
4.	ÚVOD	5
5.	PRINCIP STANOVENÍ	6
6.	UPOZORNĚNÍ	6
7.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	7
8.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	8
9.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	9
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	10
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	11
12.	POSTUP STANOVENÍ	12
13.	VYHODNOCENÍ	21
14.	LIMITACE SOUPRAVY	23
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	23
16.	ČASTO KLADENÉ DOTAZY	24
17.	REFERENCE	25
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	26

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
	CZE.001.A
Nové vydání	

1. ÚČEL POUŽITÍ

RDNGS0016 BioVendor fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genů *H3F3A* (kodony 28 a 35), *IDH1* (kodon 132) a *IDH2* (kodony 140 a 172) sekvenováním nové generace (NGS).

Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.

1.1 Použité zkratky

Ct	číslo cyklu (Cycle Threshold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/ Asymmetrical Cyanine Dye
FFPE	vzorky fixované formalinem a zalité v parafinu (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded)
<i>H3F3A</i>	gen pro histon H3.3
<i>IDH1/2</i>	gen pro isocitrát dehydrogenázu 1 a 2 (Isocitrate Dehydrogenase 1 or 2)
LoD	limit detekce (Limit of Detection)
NC	negativní kontrola (Negative Control)
NGS	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)
RFU	relativní fluorescenční jednotky (Relative Fluorescence Units)

2. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA

- **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 onkomarkerů (*H3F3A*, *IDH1*, *IDH2*).
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů, a **sekvenační primery**.
- Souprava fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit je určena pro vyšetření mutací v genech *H3F3A*, *IDH1* a *IDH2* u 16 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit vyžaduje **pouze přidání izolované DNA** ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru.

3. 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 H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

Nádory centrálního nervového systému jsou rozmanitou skupinou onemocnění. Pro hodnocení prognózy onemocnění a pro diferenciální diagnostiku nádorů mozku se využívají informace o mutačním statusu genů *IDH1* (kodon 132), *IDH2* (kodon 172) a *H3F3A* (známý také jako *H3-3A*). Ukazuje se, že mutace *IDH1* a *IDH2* jsou přítomny u většiny nízkostupňových difúzních a anaplastických astrocytových, oligodendroglálních a smíšených oligodendroglálních neoplasmů, jakož i u sekundárních glioblastomů [1–4]. Mutace *H3F3A* jsou přítomny u difúzních středočarových gliomů (kodon 28) a u difúzních hemisférických gliomů (kodon 35) [1, 5].

Mutace v genech *IDH1* (kodon 132) a *IDH2* (kodon 140 a 172) jsou také detekovány u akutní myeloidní leukemie (AML), kde se jejich hodnocení využívá pro diferenciální diagnostiku a k definování prognózy onemocnění [4, 6].

Personalizovaná terapie může pro pacienty s různými druhy závažných nádorových onemocnění znamenat velkou naději na prodloužení a zkvalitnění života. Vhodné prediktivní molekulární markery umožňují zvýšit celkovou efektivitu a snížit finanční náklady na terapii [3, 4].

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.

Genetický screening založený na metodě NGS je vysoce citlivý, specifický a vhodný pro diagnostiku.

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 v jednom běhu
- Sekvenci pro navázání DNA konstruktů na povrch flowcell

5. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření mutačního statusu klinicky relevantních onkomarkerů *H3F3A*, *IDH1* a *IDH2* pomocí NGS. Princip stanovení využívá krátkých amplikonů získaných pomocí jediné polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery, kdy dochází k amplifikaci úseků o délce do 217 párů bází a následnému 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.

Příprava sekvenační knihovny pomocí soupravy fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit vyžaduje pouze přidání izolované DNA ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru.

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

6. UPOZORNĚNÍ

- **Pouze pro profesionální použití vyškolenými pracovníky v adekvátním laboratorním prostředí.**
- Komponenty soupravy fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN H3F3A/IDH1/2 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 s biologickým materiálem.

7. TECHNICKÁ DOPORUČENÍ

- 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 soupravy.
- Master Mixy nealikvotujte ani opakovaně nerozmrazujte, vícenásobné rozmražení může negativně ovlivnit kvalitu testu.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazujte těsně před použitím. Minimalizujte dobu, kdy jsou reagenty při běžné laboratorní teplotě. Pracujte na ledu nebo za použití chladících stojánků.
- Před použitím reagenty promíchejte jemným vortexováním a krátce zcentrifugujte.
- 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.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

8. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 16 vzorků (Tabulka č. 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** pro geny *H3F3A*, *IDH1* a *IDH2*.

Složení soupravy fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit	Sekvence indexů	Objem v 1 zkušavce (μl)	Počet zkušavek	Forma dodání
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i730	AGACGCGC	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i731	CATGGACC	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i732	CCTATTAC	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i733	GAGGATAC	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i735	GTATACCA	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i736	GGAAGTAA	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i738	ATCCTCAA	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i741	CGTTGGTT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i742	TTGGCGTT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i743	GACCAGTT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i744	AAGTTCTT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i747	CTACTGGT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i748	AATACGGT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i753	GCTTCTCT	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i758	ATTAGCTG	18	1	přímé použití
H3F3A/IDH1/2 Master Mix i759	CGAATATG	18	1	přímé použití
R2SP H3F3A/IDH1/2		29	1	k ředění
ISP H3F3A/IDH1/2		29	1	k ředění

Tabulka 1: Složení soupravy fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit.

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů *H3F3A*, *IDH1*, *IDH2* (vhodný jako **pozitivní kontrola**)
- Voda pro molekulární biologii (Nuclease Free Water, vhodná jako **negativní kontrola**)
- Sekvenační kit
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies)
- NaOH (p.a.)
- Tween 20
- Kit nebo magnetické částice pro purifikaci DNA poolu
- Komerčně dostupné roztoky pro dekontaminaci povrchů

9.2 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; tenká plastová Pasteurova pipeta
- Ochranné pomůcky (rukavice, oděv)

9.3 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

10. 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.

10.1 fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit: Master Mix

Pro genotypizaci genů *H3F3A*, *IDH1* a *IDH2* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek Master Mix a uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

10.2 Sekvenační primery

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

- 1 zkumavku: R2SP H3F3A/IDH1/2
- 1 zkumavku: ISP H3F3A/IDH1/2

Vzor

11. PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.
- Stanovte vhodné ředění na základě koncentrace vstupní DNA dle Tabulky č. 2.
- Příliš koncentrovaná DNA může vést k inhibičním jevům PCR a nesprávným výsledkům. Vzorky o velmi nízké koncentraci DNA neředěte a zahrňte je do analýzy v duplikátu (pipetujte 5 µl DNA do zkumavek se 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 12. Postup stanovení.

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

Tabulka 2: Stanovení vhodného ředění DNA do PCR.

Doporučení:

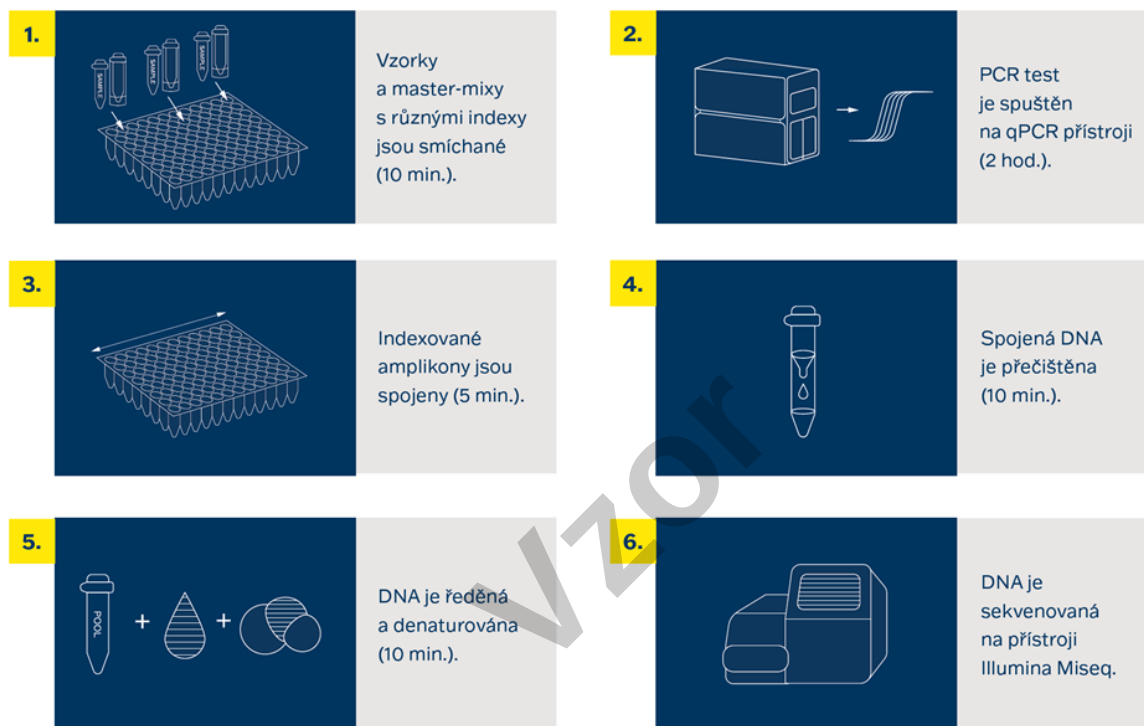
Do každého běhu testování pomocí fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit je doporučeno přidávat **pozitivní kontrolu (PC)** (standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů, není dodáván se soupravou) a **negativní kontrolu (NC)** pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. Při nedodržení tohoto doporučení nelze vyloučit falešně pozitivní či negativní výsledky. PC připravte obdobným ředěním jako vyšetřované vzorky DNA.

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.

12. 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 5 %.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 16 vzorků pro genotypizaci genů *H3F3A*, *IDH1*, *IDH2* v jednom sekvenačním běhu.



Obrázek 1: Schéma postupu genotypizace pomocí soupravy fastGEN.

12.1 Příprava DNA knihovny

12.1.1 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 µl vzorku DNA** o vhodné koncentraci (viz kapitola 11).
- Doporučení:
 - Zahrňte mezi skupinu vyšetřovaných vzorků také pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrolu.
 - Pipetujte **5 µl DNA pozitivní kontroly** o vhodné koncentraci (viz kapitola 11).
 - Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu.

12.1.2 Příprava Master Mixů

Pracujte ve vhodném PCR boxu v pre-PCR místnosti.

- Označte si PCR desku nebo stripy.
- Po rozmražení Master Mixy krátce vortexujte a centrifugujte.
- Ke každému vzorku nebo kontrole přidejte **15 µl** Master Mixu.
- Celkový objem PCR reakce je **20 µl**.
- 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 PCR desku lepicí fólií nebo uzavřete mikrozskumavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280 x g).

12.1.3 qPCR

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

Detekce signálu probíhá v **amplifikačním cyklu***, v kanálu **FAM/SYBR/Green channel**.

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	
Křivka tání†		60 °C → 95 °C	
Chlazení	∞	4 °C	

Tabulka 3: Program qPCR amplifikace († volitelný krok).

- Zadejte identifikaci vzorků do ovládacího programu Real-Time PCR termocykleru.
- Spustěte nastavený amplifikační program se vzorky.
- Zpracujte a 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.

12.2 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.**

12.2.1 Spojení ampliconů v DNA pool

- Po ukončení qPCR amplifikace zkumavky s amplikony krátce zcentrifugujte.
- Pro vytvoření knihovny pro genotypizaci genů *H3F3A*, *IDH1*, *IDH2*:
 - Smíchejte jednotlivé amplikony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 16 vzorků smíchejte jednotlivé amplikony v množství 2 µl PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 32 µl.
 - 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. V případě, že vzorek vykazuje hodnotu $Ct > 36$ nebo nevykazuje amplifikaci, do DNA poolu ho nepřidávejte a vyřadte jej ze sekvenace.
- 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.

12.2.2 Purifikace DNA poolu

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

12.2.3 Kvantifikace DNA poolu

- Fluorimetricky stanovte koncentraci DNA poolu po jeho přečištění.
- 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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 217)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- **217 je orientační průměrná velikost molekuly DNA po indexaci [bp]**
- 660 g/mol je průměrná molární hmotnost jedné báze (bp)

12.3 Příprava na sekvenaci

12.3.1 Příprava sekvenátoru

Před použitím sekvenátoru, nejlépe v době, kdy probíhá qPCR, sekvenátor promyjte (tzv. „maintenance wash“) a rozmrazte sekvenační kazetu. Provedte „power cycling“ sekvenátoru.

12.3.2 Příprava custom sekvenačních primerů

Sekvenační knihovna připravená pomocí fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina®. Naředte custom sekvenační primery R2SP a ISP pufrem HT1 nebo Illumina® sekvenačními primery dle používaného sekvenátoru, zvortexujte a krátce zcentrifugujte. V případě míchání fastGEN knihoven s jinými knihovnami vyžadujícími Illumina sekvenační primery, použijte k ředění místo HT1 pufru příslušný Illumina sekvenační primer. **Pro Read 1 použijte Illumina® sekvenační primery.** Uvedte použití custom pozic v SampleSheetu a v nastavení přístroje.

12.3.3 Ředění a denaturace DNA poolu

Naředte purifikovaný DNA pool na požadovanou koncentraci dle doporučení Illumina® a dle používaného sekvenátoru.

Provedte denaturaci vhodně naředěného DNA poolu NaOH. Vždy je nutné připravit čerstvý roztok NaOH. Zředte denaturovaný DNA pool vychlazeným pufrem HT1 z lednice na finální koncentraci. Před aplikací uchovejte DNA pool v lednici.

12.3.4 Příprava sekvenační kazety, spuštění sekvenačního programu

Zkontrolujte, že sekvenační kazeta je dokonale rozmražená a zamíchejte její obsah převrácením (3x). Připravte flowcellu podle pokynů výrobce a spusťte sekvenační program (software od Illumina®). Postupujte podle pokynů výrobce přístroje.

Na jeden vzorek je potřeba **cca 50 000 paired-end readů**. Při nastavování runu uveďte délku čtení 151 bp (paired-end read) a velikost indexu 8 bp.

12.3.5 Doporučení pro sekvenátor typu MiSeq

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 1,6–2,4 nM. Denaturujte 5 µl DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveného 0,2M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Zřed'te denaturovaný DNA pool vychlazeným puřem HT1 na finální koncentraci 10 pM (např. 10 µl DNA pool + 990 µl HT1). Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Připrava sekvenačních primerů:

- Čistou pasteuřovou pipetou vyjměte Illumina sekvenační primery pro Read 1 z pozice 12 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 6 µl ISP H3F3A/IDH1/2 + 594 µl HT1
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 6 µl R2SP H3F3A/IDH1/2 + 594 µl HT1

Pipetujte 600 µl naředěné 10pM DNA knihovny a naředěných sekvenačních primerů do sekvenační kazety do pozic 17–20:

pozice 17: DNA knihovna v HT1

pozice 18: Illumina® sekvenační primery pro Read 1 odebrané z pozice 12

pozice 19: naředěný ISP v HT1

pozice 20: naředěný R2SP v HT1

12.3.6 Doporučení pro sekvenátor MiniSeq

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 0,8–1,2 nM. Denaturujte 5 µl DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveným 0,2M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Přidejte 5 µl 200mM Tris-HCl. Zředte denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 5 pM. Následně naředte 5pM DNA pool vychlazeným HT1 na finální koncentraci 1,4 pM (např. 150 µl DNA 5pM pool + 385 µl HT1) nebo 1,6 pM (např. 150 µl DNA 5pM pool + 319 µl HT1). Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Příprava sekvenačních primerů:

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 24 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 4,9 µl ISP H3F3A/IDH1/2 + 815,1 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 28)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 3,7 µl R2SP H3F3A/IDH1/2 + 606,3 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 25)

Pipetujte 500 µl naředěné 1,4pM nebo 1,6pM DNA knihovny a všechny naředěné sekvenační primery do sekvenační kazety do pozic 13–16:

pozice 16: DNA knihovna v HT1

pozice 15: Illumina® sekvenační primery pro Read 1 odebrané z pozice 24

pozice 13: naředěný ISP

pozice 14: naředěný R2SP

12.3.7 Doporučení pro sekvenátor NextSeq 500/550

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 3,6–4,4 nM. Přidejte fastGEN DNA pool k zředěnému poolu další sekvenační knihovny. Denaturujte 5 µl celkového DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveného 0,2 M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Přidejte 5 µl 200mM Tris-HCl. Zředte denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 20 pM. Následně naředte 20pM DNA pool vychlazeným HT1 na finální koncentraci 1,5 pM (např. 100 µl 20pM DNA pool + 1 233 µl HT1) pro Mid Output nebo 1,8 pM (např. 120 µl 20pM DNA pool + 1 213 µl HT1) pro High Output. Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Příprava sekvenačních primerů (Mid Output):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 20 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 12 µl ISP H3F3A/IDH1/2 + 1988 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 9 µl R2SP H3F3A/IDH1/2 + 1491 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 21)

Příprava sekvenačních primerů (High Output):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 20 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 12 µl ISP H3F3A/IDH1/2 + 1988 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 12 µl R2SP H3F3A/IDH1/2 + 1988 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 21)

Pipetujte 1 300 µl naředěné 1,5pM nebo 1,8pM DNA knihovny a všechny naředěné sekvenační primery do sekvenační kazety do pozic 7–10:

pozice 10: DNA knihovna v HT1

pozice 7: Illumina® sekvenační primery pro Read 1 odebrané z pozice 20

pozice 9: naředěný ISP

pozice 8: naředěný R2SP

12.3.8 Doporučení pro sekvenátor NovaSeq, reagent kit v1.5 SP, S1, S2, S4

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 1–2 nM. Přidejte fastGEN DNA pool ke zředěnému poolu další sekvenační knihovny. Typicky fastGEN knihovna vyžaduje 0,1–1 % sekvenační kapacity kitu NovaSEQ SP. Ředění a podíl je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty a počtu čtení na vzorek. Denaturujte celkový DNA pool (SP/S1 100 µl; S2 150 µl; S4 310 µl) pomocí čerstvě připraveného 0,2M NaOH (SP/S1 25 µl; S2 37 µl; S4 77 µl) po dobu 8 min při pokojové teplotě. Přidejte 400mM Tris-HCl (SP/S1 25 µl; S2 38 µl; S4 78 µl).

Příprava sekvenačních primerů (pro dostatečné množství sekvenačních primerů pro S4 NovaSeq je nutno dokoupit fastGEN H3F3A/IDH1/2 Extra Sequencing Primers, RDNSP0016A):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 24 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP, pro SP, S1, S2): 21 µl ISP H3F3A/IDH1/2 + 3 479 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Index sekvenační primery (ISP, pro S4 Novaseq): 30 µl ISP H3F3A/IDH1/2 + 4 970 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro SP, S1, S2): 12 µl R2SP H3F3A/IDH1/2 + 1 988 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 13)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro S4 Novaseq): 21 µl R2SP H3F3A/IDH1/2 + 3 479 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 13)

Pipetujte 150 µl (SP, S1), 225 µl (S2), 465 µl (S4) naředěné, denaturované a neutralizované knihovny a naředěné sekvenační primery do sekvenační kazety do pozic 5–8:

pozice 8: DNA knihovna v HT1

pozice 5: Illumina® sekvenační primery pro Read 1 odebrané z pozice 24 (2 000 µl pro SP, S1, S2; 3 500 µl pro S4)

pozice 7: naředěný ISP

pozice 6: naředěný R2SP

Poznámka: V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, kontaktujte aplikační podporu.

Vzor

13. 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

13.1 Genotypizace H3F3A, IDH1 a IDH2

Výsledek genotypizace **H3F3A**, **IDH1** a **IDH2** je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byla detekována varianta pro kodony 28 a 35 genu **H3F3A**, 132 genu **IDH1** a 140, resp. 172 genu **IDH2** s frekvencí $\geq 5\%$.

V případě pozitivního nálezu mutace v genech **H3F3A**, **IDH1** a **IDH2** v rozsahu frekvence 1–5 % doporučujeme vyšetření zopakovat nebo verifikovat jinou metodou.

Výsledek genotypizace pro **vzorky s velmi nízkou koncentrací DNA** je považován za validní, pokud se výsledek detekce varianty genu shoduje pro oba replikáty s odlišnými Master Mixy.

13.2 Negativní výsledek

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

13.3 Interpretace PC a NC

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

13.3.1 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 sekvenačních dat vykazuje přítomnost daných variant genů *H3F3A*, *IDH1* a *IDH2* v předepsaných frekvencích.

13.3.2 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 16. Často kladené dotazy.

14. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit je validována na DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích a na DNA izolované z plné krve.
- 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 H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenční knihovny, potřebné pro genotypizaci genů *H3F3A* (kodony 28 a 35), *IDH1* (kodon 132) a *IDH2* (kodony 140 a 172) technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů, nejsou kitem fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit zjistitelné.
- Negativní výsledek nevylučuje mutace pod limitem detekce metody.
- Vzácné sekvenční varianty v oblasti primerů mohou ovlivnit funkčnost jednotlivých fastGEN primerů a mohou vést ke snížení efektivity amplifikace daného amplikonu.

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

15. CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY

Vyhodnocením dat v rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN H3F3A/IDH1/2 Cancer Kit firmy BioVendor byly stanoveny parametry analytické senzitivity a specifity. Pro soupravu byl stanoven limit detekce metody a ověřena křížová reaktivita primerů (*in silico*). Byla testována opakovatelnost a robustnost metody na sérii totožných vzorků ve dvou nezávislých experimentech s definovanou změnou podmínek. Diagnostická přesnost (senzitivita a specifita) testu byla stanovena na základě analýzy klinických vzorků se známým mutačním statusem. Výsledky stanovení genotypu genů *H3F3A*, *IDH1* a *IDH2* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech včetně opakování (senzitivita a specifita 100 %).

16. ČASTO Kladené DOTAZY

1. Kolik vzorků lze sekvenovat současně v 1 běhu?

Na jeden vzorek je potřeba 50 000 paired-end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má kapacitu 2 mil paired-end readů, je dostačující až pro 16 vzorků a je zaplněn ze 40 %. MiSeq Reagent kit v2 Micro, který má 8 mil paired-end readů je při sekvenaci 16 vzorků zaplněn z 10 %.

2. Lze použít i jiný nástroj na analýzu dat?

Ano, na sekundární analýzu dat je možné použít např. Local Run Manager nebo BaseSpace Sequencing Hub.

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, 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.

6. Co dělat v případě spotřebování veškerého objemu sekvenačních primerů?

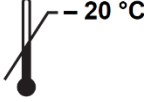
Je možné zakoupit související produkt fastGEN H3F3A/IDH1/2 Extra Sequencing Primers RDNSP0016A.

17. REFERENCE

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

- [1] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. 2016. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization histological classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, WHO.
- [2] Yan H, Parsons DW, Jin G, *et al.* 2009. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*, 360(8), 765–773.
- [3] Guo C, Pirozzi CJ, Lopez GY, Yan H. 2011. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. *Curr Opin Neurol*. 24(6):648–652.
- [4] Guo J, Zhang R, Yang Z, *et al.* 2021. Biological Roles and Therapeutic Applications of *IDH2* Mutations in Human Cancer. *Front Oncol*. 11:644857.
- [5] Williams EA, Brastianos PK, *et al.* A comprehensive genomic study of 390 H3F3A-mutant pediatric and adult diffuse high-grade gliomas, CNS WHO grade 4. *Acta Neuropathol* 146, 515–525 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02609-6>
- [6] Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-1377. doi:10.1182/blood.2022016867

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

Vzor



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com