

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0011

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.	ÚČEL POUŽITÍ	4
2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	6
3.	SKLADOVÁNÍ	6
4.	ÚVOD	7
5.	PRINCIP STANOVENÍ	8
6.	UPOZORNĚNÍ	8
7.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	9
8.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	10
9.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	11
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	12
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	13
12.	POSTUP STANOVENÍ	17
13.	VYHODNOCENÍ	26
14.	LIMITACE SOUPRAVY	29
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	30
16.	ČASTO Kladené DOTAZY	31
17.	REFERENCE	32
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	33

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.001.A	CZE.002.B
Celý dokument, přečíslovány tabulky a obrázky.	
Kapitola 1, doplněna tabulka 1.	
Kapitola 3, doplnění informací o opakovaném přemražení sekvenačních primerů a Master Mixů Major a Minor.	
Kapitola 9.1., opraven doporučovaný kit pro přepis RNA do cDNA.	
Kapitola 11.1.1, doplněn doporučovaný kit pro přepis RNA do cDNA.	
Kapitola 11.1.2, vložena nová kapitola – zbytek přečíslován.	
Kapitola 11.1.4, vložen Obrázek 2 s komentářem.	
Kapitola 12, aktualizace Obrázek 3.	
Kapitola 13, kompletně přepracovaná.	
Kapitola 14, přidána informace o přesnosti limitu detekce.	
Kapitola 15, doplnění celého jména společnosti.	
Kapitola 16, otázka 5, doplnění informace o sekvenované NC.	
Kapitola 16, otázka 6, konkrétní upřesnění testovaných kitů pro přepis RNA do cDNA.	

1. ÚČEL POUŽITÍ

RDNGS0011 fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci kinázové domény fúzního genu *BCR::ABL1* sekvenováním nové generace (NGS). Genotypizace pomocí fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kitu umožňuje analýzu mutací v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1*. Přesná specifikace vybraných oblastí zájmu je uvedena v *Tabulka 1*.

Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je cDNA obsahující fúzní gen *BCR::ABL1*.

Označení oblasti	Specifikace oblasti	Pozice oblasti dle GRCh38/hg38		
		Chromozom	Start	Stop
ABL1 exon 4	Část exonu	chr9	130 862 881	130 863 035
ABL1 exon 5	Kompletní exon	chr9	130 872 130	130 872 213
ABL1 exon 6-a	Část exonu	chr9	130 872 861	130 872 931
ABL1 exon 6-b	Část exonu	chr9	130 872 971	130 873 037
ABL1 exon 7-a	Část exonu	chr9	130 874 869	130 874 987
ABL1 exon 7-b	Část exonu	chr9	130 875 031	130 875 052
ABL1 exon 8	Kompletní exon	chr9	130 878 416	130 878 567
ABL1 exon 9	Kompletní exon	chr9	130 880 069	130 880 157
ABL1 exon 10	Část exonu	chr9	130 880 501	130 880 571

Tabulka 1: Specifikace vybraných oblastí zájmu soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit

1.1 Použité zkratky

<i>ABL1</i>	ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase
ATP	adenosintrifosfát
<i>BCR</i>	BCR Activator Of RhoGEF And GTPase
<i>BCR::ABL1</i>	fúzní gen <i>BCR::ABL1</i>
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
Ct	číslo cyklu (Cycle Threshold)
CML	chronická myeloidní leukémie
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
ELFO	elektroforéza
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/ Asymmetrical Cyanine Dye
IS	International Scale
KD	kinázová doména
LoD	limit detekce (Limit of Detection)
NC	negativní kontrola (Negative Control)
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
NTC	negativní kontrola bez templátu (No Template Control)
PC	pozitivní kontrola (Positive Control)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
TKI	inhibitor tyrozinkináz
T _m	teplota tání (melting temperature)
VAF	frekvence alelové varianty (Variant Allele Frequency)

2. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA

- **Pouze pro výzkumné účely.**
- Vstupním materiálem pro fastGEN analýzu je **cDNA**.
- Celková doba přípravy sekvenační knihovny je kratší než 5 hodin a zahrnuje méně než **60 minut laboratorních operací**.
- Technologie je založena na preamplifikaci fúzního genu *BCR::ABL1* a následné **rychlé a robustní jednokrokové přípravě** sekvenační knihovny za účelem genotypizace kinázové domény tohoto genu.
- Souprava obsahuje kompletní Master Mixy k přímému použití: Master Mixy pro preamplifikaci traskripčních variant major nebo minor fúzního genu *BCR::ABL1*, Master Mix pro fastGEN (včetně indexů) a sekvenační primery.
- Master Mix pro preamplifikaci fúzního genu *BCR::ABL1* se zlomem **major** je dodáván ve **2 alikvotech** (tzn. 2 zkumavkách) a Master Mix pro preamplifikaci fúzního genu *BCR::ABL1* se zlomem **minor** jako **1 alikvot** (tzn. 1 zkumavka).
- Master Mix pro fastGEN je dodáván pro každý vyšetřovaný vzorek ve **2 zkumavkách** (Master Mix A a Master Mix B).
- Souprava fastGEN *BCR::ABL1* Cancer Kit je určena pro vyšetření mutací v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1* u 16 vzorků s unikátní kombinací indexů v jednom sekvenačním běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN *BCR::ABL1* Cancer Kit vyžaduje pouze **přidání cDNA do preamplifikační qPCR reakce**, následně přidání jejího **produktu** do konkrétního **fastGEN Master Mixu** a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru. Master Mix pro preamplifikaci je dodáván se soupravou.

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 *BCR::ABL1* Cancer Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN *BCR::ABL1* Cancer Kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení Master Mixů.
- Sekvenační primery lze použít až 3x. Master Mixy Major a Minor lze použít až 5x.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

Molekulární monitorování pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) je v době používání inhibitorů tyrozinkináz (TKI) klíčovou součástí léčebného protokolu. Pro CML je charakteristická přítomnost fúzního genu *BCR::ABL1*, který vzniká v důsledku translokace t(9;22)(q34;q11.2). Fúzní gen *BCR::ABL1* produkuje patologickou, konstitutivně aktivovanou tyrosinkinázu Bcr-Abl, která je zodpovědná za nekontrolovanou proliferaci krvetvorných buněk a jejich sníženou odpověď na proapoptotické signály.

Tyrozinkinázová aktivita Bcr-Abl může být inhibována pomocí TKI, které cílí na ATP vazebné místo v kinázové doméně (KD) a stabilizují neaktivní konformaci Bcr-Abl, čímž snižují procento patologických buněk a zvyšují celkovou dobu přežití nemocných.

Navzdory úspěchu těchto léčiv cílících na ATP vazebné místo, pacienti trpí špatnou počáteční odpovědí nebo ztrátou odpovědi v důsledku vzniku rezistence na podávané léčivo. Rezistence k inhibitorům tyrosin kináz se vyskytuje přibližně u 13 % pacientů [1]. Nyní je popsáno přes 90 odlišných mutací, přičemž mezi ty nejvíce signifikantní patří: T315, Y253, E255, M351, G250, F359 a H396 [2].

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 flowcellu

5. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření mutačního statusu v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1* 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 315 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 BCR::ABL1 Cancer Kit vyžaduje pouze přidání cDNA do preamplifikační qPCR reakce, následně přidání jejího produktu ke konkrétnímu fastGEN Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru, Master Mix pro preamplifikaci je dodáván se soupravou.

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 BCR::ABL1 Cancer Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN BCR::ABL1 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.
- fastGEN 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 BCR::ABL1 Cancer Kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 16 vzorků. Souprava obsahuje kompletní **preamplifikační Master Mixy** k provedení 20 reakcí pro major zlom a 5 reakcí pro minor zlom, **specifické fastGEN Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** k analýze kinázové domény fúzního genu **BCR::ABL1**.

Složení soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit	Sekvence indexů	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
Master Mix Major		460	2	přímé použití
Master Mix Minor		230	1	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i730 (A-B)	AGACGCGC	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i731 (A-B)	CATGGACC	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i741 (A-B)	CGTTGGTT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i743 (A-B)	GACCAGTT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i744 (A-B)	AAGTTCTT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i746 (A-B)	TCTCTATT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i747 (A-B)	CTACTGGT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i748 (A-B)	AATACGGT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i751 (A-B)	CCGGAAGT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i753 (A-B)	GCTTCTCT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i754 (A-B)	AGCGATCT	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i757 (A-B)	GTACCTTG	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i761 (A-B)	ATGGTTGG	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i764 (A-B)	TTCTTGCG	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i767 (A-B)	GAGCTACG	18	2	přímé použití
BCR::ABL1 Master Mix i768 (A-B)	GACTGCAG	18	2	přímé použití
R2SP BCR::ABL1 Cancer		35	1	k ředění
ISP BCR::ABL1 Cancer		35	1	k ředění

Tabulka 2: Složení soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek cDNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného fúzního genu *BCR::ABL1* (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
- **Kit pro reverzní transkripci** (doporučený kit: **SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System**, Invitrogen™; Katalogové číslo: 18091050, Thermo Fischer Scientific)
- 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 zkumavku s Master Mixem pro preamplifikaci a odpovídající počet zkumavek s fastGEN 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 Preamplifikační Master Mix Major/Minor

Pro amplifikaci cDNA fúzního genu *BCR::ABL1* nechte rozmrazit zkumavku preamplifikačního Master Mixu Major nebo Minor zlom dle analýzy dané varianty transkriptu. Danou komponentu uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

10.2 fastGEN *BCR::ABL1* Cancer Kit Master Mix

Pro genotypizaci kinázové domény fúzního genu *BCR::ABL1* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek *BCR::ABL1* Master Mixů A i B a uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

10.3 Sekvenační primery

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

- 1 zkumavku: R2SP *BCR::ABL1* Cancer
- 1 zkumavku: ISP *BCR::ABL1* Cancer

11. PŘÍPRAVA VZORKŮ

11.1.1 Reverzní transkripce RNA

U vzorku RNA nejprve proveďte reverzní transkripci do cDNA. **Kit pro reverzní transkripci není dodáván se soupravou.** Doporučujeme použít SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System.

Doporučení:

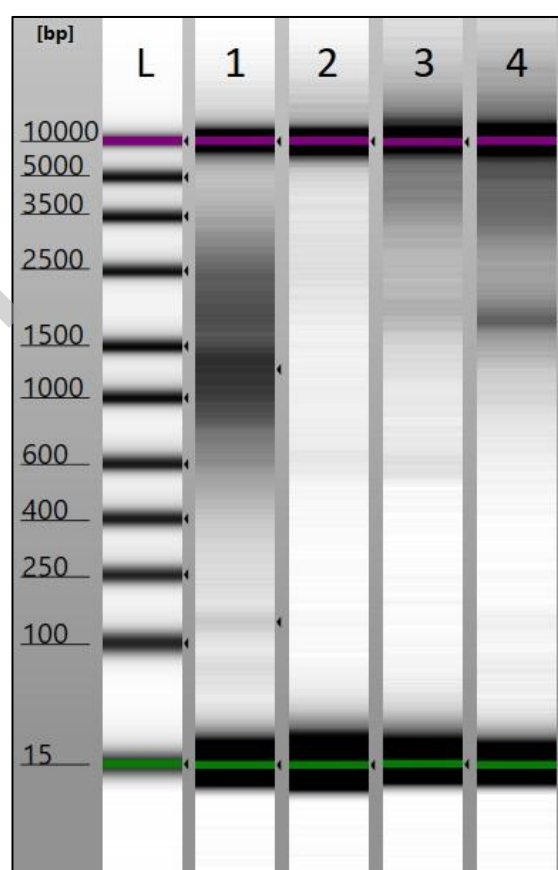
- U **vzorků s nízkou hladinou fúzního genu BCR::ABL1** (tzn. IS < 1 %) doporučujeme provádět reakci s maximálním možným vstupem RNA dle pokynu výrobce kitu pro reverzní transkripci.

11.1.2 Kontrola kvality vstupní cDNA

Po provedení reverzní transkripce RNA do cDNA ověřte dostatečnou délku vzniklých fragmentů pomocí elektroforézy nebo jiné vhodné analytické metody.

Reagencie nezbytné pro provedení tohoto ověření nejsou dodávány se soupravou. Optimální délka fragmentů po přepisu činí minimálně 5 000 bp; fragmenty kratší než 1 700 bp nejsou pro analýzu vzorku pomocí soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit vhodné.

Obrázek 1: Zobrazení výsledku ověření velikosti cDNA fragmentů. Na pozici L je umístěn velikostní marker pro určení délky fragmentů nukleových kyselin ve vzorku. Vzorek na pozici 1 je nevyhovující, protože většina fragmentů má délku přibližně 1 000–1 500 bp. Vzorek na pozici 2 vykazuje nízkou intenzitu signálu, avšak obsahuje fragmenty cDNA s převážně vyšší délkou. Tento vzorek lze analyzovat, nicméně je nezbytné ověřit velikost produktů preamplifikace pomocí elektroforézy (viz kapitola 11.1.3). Vzorky na pozicích 3 a 4 splňují požadovaná kritéria. Vzorek na pozici 3 obsahuje fragmenty cDNA o délce přesahující 2 500 bp. Vzorek na pozici 4 obsahuje fragmenty cDNA o délce nad 3 500 bp, ale také významné množství fragmentů s velikostí mírně přesahující 1 500 bp.



11.1.3 Příprava preamplifikační reakce

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Analýza jednoho vzorku cDNA zahrnuje preamplifikační qPCR a dvě oddělené fastGEN qPCR.
- Označte si PCR desku nebo stripu a cDNA vzorky krátce vortexujte a centrifugujte.
- Rozmrázte preamplifikační **Master Mix Major** nebo **Master Mix Minor** podle varianty transkriptu vyšetřovaného fúzního genu.
- Rozmražený Master Mix krátce vortexujte a centrifugujte.
- Do PCR destičky anebo stripu pipetujte **45 µl preamplifikačního Master Mixu** a **5 µl vzorku cDNA**.
- Celkový objem PCR reakce je **50 µl**.
- Uzavřete mikrozkušavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280 x g).

Doporučení:

- Preamplifikační reakci provádějte ve stripu nebo zkumavce se samostatně uzavíratelným víčkem, aby v průběhu pipetování fastGEN reakce nemohlo dojít ke vzájemné kontaminaci.
- **U vzorků s nízkou hladinou fúzního genu BCR::ABL1 (IS < 1 %) doporučujeme provádět reakci v duplikátu.**
- Do každého běhu testování pomocí fastGEN BCR::ABL1 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 cDNA.
- **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.

11.1.4 Preamplifikační reakce

- Na Real-Time PCR termocykleru nastavte amplifikační program dle Tabulka 3. Detekce signálu probíhá v **amplifikačním cyklu***, v kanálu **FAM/SYBR/Green channel**.

Krok	Čas	Teplota	
Denaturace	30 s	98 °C	
Amplifikační cyklus	5 s	98 °C	40 cyklů
	60 s	72 °C*	
Finální elongace	2 min	72 °C	
Křivka tání		72 °C → 95 °C	
Chlazení	∞	4 °C	

Tabulka 3: Program qPCR preamplifikace.

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

Doporučení:

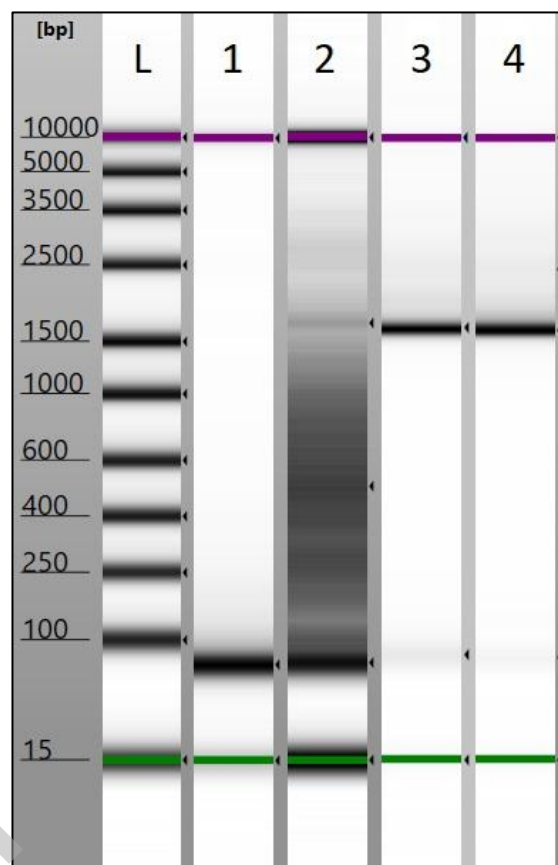
Po preamplifikaci cDNA opět ověřte dostatečnou délku vzniklých fragmentů pomocí elektroforézy nebo jiné vhodné analytické metody. Adekvátní délka amplikonů je cca 1 650 bp pro zlom e13a2 (major) a zlom e1a2 (minor). V případě zlomu e14a2 je velikost amplikonů větší (cca 1 725 bp).

Obrázek 2: Zobrazení výsledku ověření velikosti amplikonů po preamplifikaci. Na pozici L je umístěn velikostní marker pro určení délky fragmentů nukleových kyselin ve vzorku. Vzorek na pozici 1 je amplifikovaná cDNA z pozice 1 viz Obrázek 1:

Zobrazení výsledku ověření velikosti cDNA fragmentů.

Na pozici L je umístěn velikostní marker pro určení délky fragmentů nukleových kyselin ve vzorku. Vzorek na pozici 1 je nevyhovující, protože většina fragmentů má délku přibližně 1 000–1 500 bp. Vzorek na pozici 2 vykazuje nízkou intenzitu signálu, avšak obsahuje fragmenty cDNA s převážně vyšší délkou. Tento vzorek lze analyzovat, nicméně je nezbytné ověřit velikost produktů preamplifikace pomocí elektroforézy

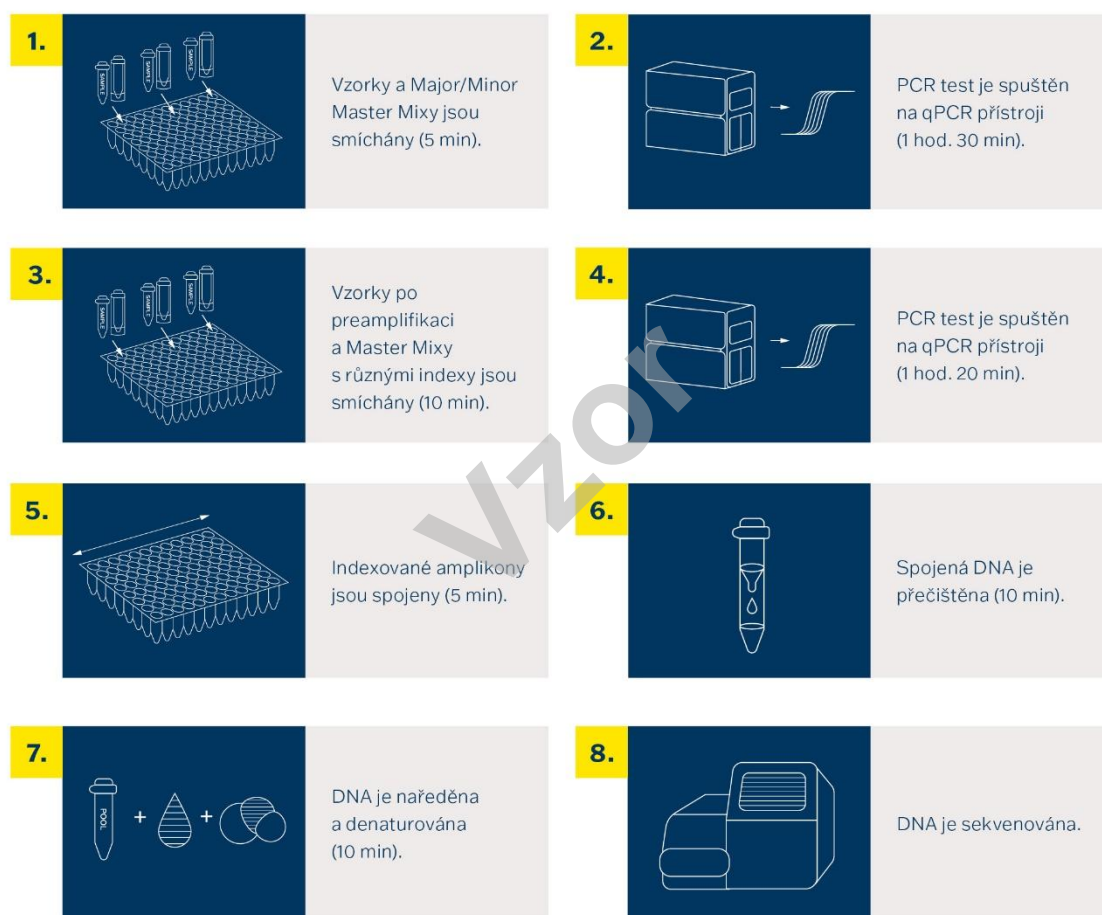
(viz kapitola 11.1.3). Vzorky na pozicích 3 a 4 splňují požadovaná kritéria. Vzorek na pozici 3 obsahuje fragmenty cDNA o délce přesahující 2 500 bp. Vzorek na pozici 4 obsahuje fragmenty cDNA o délce nad 3 500 bp, ale také významné množství fragmentů s velikostí mírně přesahující 1 500 bp. a lze pozorovat absenci amplikonů o specifické délce 1 650 bp nebo delší. S takovým vzorkem není možné pokračovat do fastGEN reakce. U vzorků na pozicích 2 až 4 lze pozorovat specifické amplikony o délce cca 1 650 bp. S těmito vzorky lze pokračovat do fastGEN reakce.



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 fúzního genu *BCR::ABL1* v jednom sekvenačním běhu.



Obrázek 3: Schéma postupu genotypizace pomocí soupravy fastGEN

12.1 Příprava DNA knihovny

12.1.1 Příprava vyšetřované cDNA

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Vzorky z preamplifikace krátce vortexujte a centrifugujte.
- Do PCR destičky anebo stripu pipetujte **5 µl produktu preamplifikace** pro Master Mixy A-B daného indexu (viz kapitola 11).

Doporučení:

- Zahrňte mezi skupinu vyšetřovaných vzorků také produkty preamplifikace pozitivní (PC) a negativní (NC) kontroly.
- Pipetujte **5 µl PCR produktu preamplifikace pozitivní kontroly (PC)** pro Master Mixy A-B daného indexu (viz kapitola 11).
- Pipetujte **5 µl PCR produktu preamplifikace negativní kontroly (NC)** pro Master Mixy A-B daného indexu (viz kapitola 11).
- Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu (**NTC**) pro Master Mixy A-B daného indexu.

12.1.2 Příprava Master Mixů

Pracujte ve vhodném PCR boxu v post-PCR místnosti.

- Označte si PCR desku nebo stripy.
- Po rozmražení Master Mixy krátce vortexujte a centrifugujte.
- Ke každému vzorku nebo kontrole přidejte postupně do dvou jamek **15 µl** Master Mixu A-B.
- 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

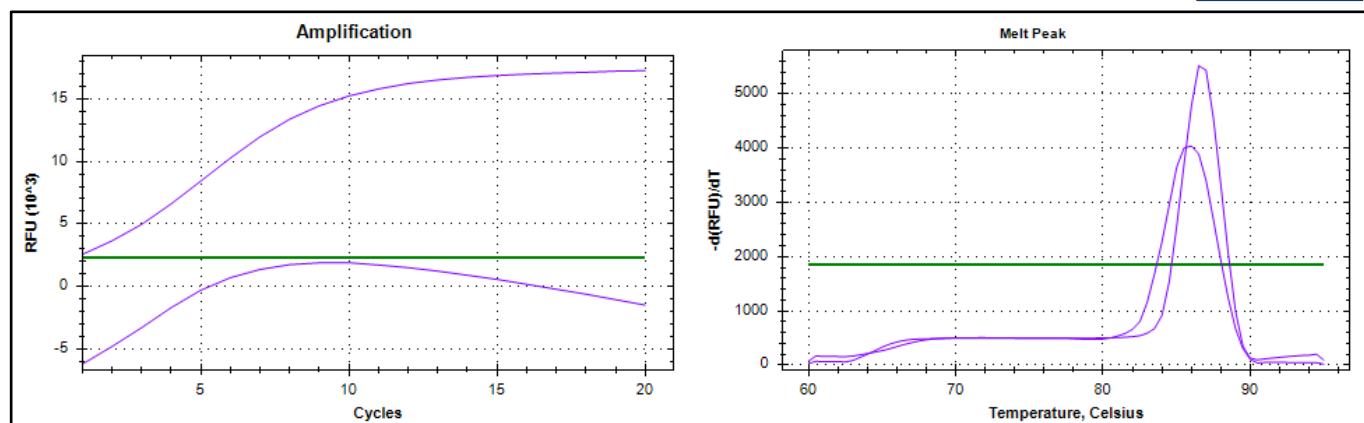
Na Real-Time PCR termocykleru nastavte amplifikační program dle Tabulka 4.

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	20 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 4: Program qPCR amplifikace

- Zadejte identifikaci vzorků do ovládacího programu Real-Time PCR termocykleru.
- Spustíte nastavený amplifikační program se vzorky.
- Exportujte qPCR data a proveďte kontrolu amplifikace. Hodnoty Ct a Tm uložte pro případnou kontrolu.
- Zkontrolujte správné nastavení hranice (tzv. „baseline threshold”) pro stanovení hodnot Ct. Pokud by do fastGEN qPCR vstupoval silně koncentrovaný vzorek, mohl by se jeho signál už od začátku reakce pohybovat nad nebo pod automaticky nastaveným thresholdem a vyhodnocovací software ho tak označí za negativní. Proto je nutné hodnotit průběh amplifikační křivky a také hodnoty Tm získané z křivky tání viz Obrázek 4.
- Produkty PCR uchovejte pro další použití při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování je uchovejte při –20 °C.



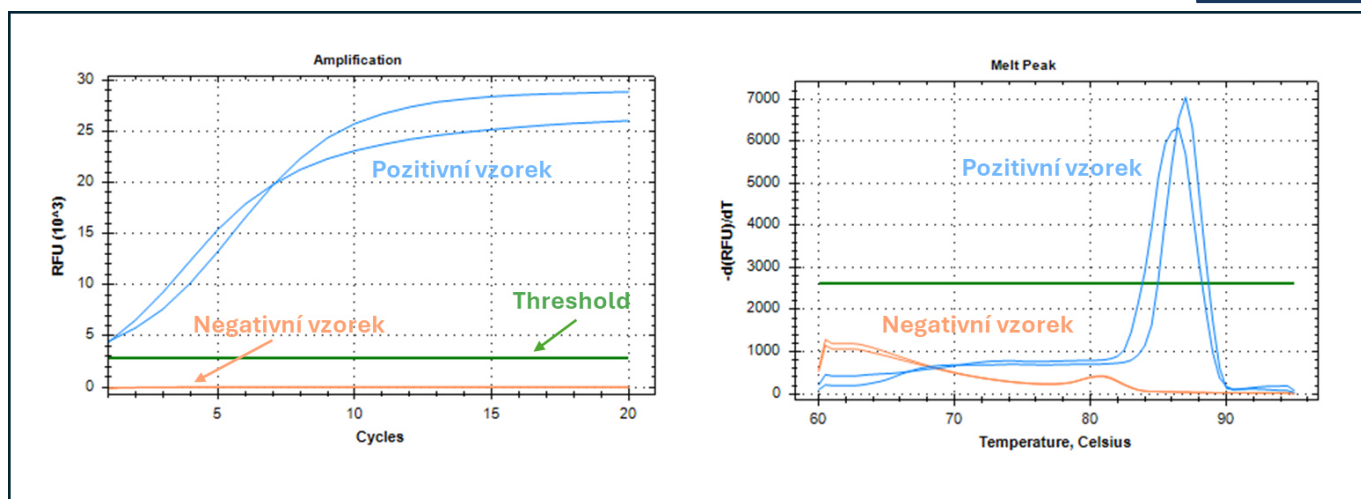
Obrázek 4: Zobrazení vysoce koncentrovaných vzorků (znázorněno fialově) ve fastGEN reakci nad a pod automatickým thresholdem (znázorněno zeleně). Obě hodnoty C_t byly vyhodnoceny jako „N/A“, ale na grafu teplot tání lze jasně rozlišit specifický „peak“ T_m ($86 \pm 1,5$ °C).

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 amplicony a DNA pool na ledu.**

12.2.1 Spojení ampliconů v DNA pool

- Po ukončení qPCR amplifikace zkušavky s amplicony krátce zcentrifugujte.
- Pro vytvoření knihovny pro genotypizaci kinázové domény fúzního genu *BCR::ABL1*:
 - Smíchejte jednotlivé amplicony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 8 vzorků smíchejte jednotlivé amplicony v množství 2 μ l PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 32 μ l.
 - Finální objem DNA poolu stanovte dle používaného kitu pro purifikaci DNA poolu.
 - Doporučení 1: V případě, že vzorek nevykazuje hodnotu C_t (tzn. vykazuje hodnotu C_t = „N/A“), zkontrolujte nastavení vyhodnocení runu a ověřte, jestli není reakce přesycena (signál vzorku by byl od začátku reakce nad hodnotou „baseline threshold“). Pokud však takový vzorek nevykazuje podle analýzy křivek tání specifickou hodnotu T_m ($86 \pm 1,5$ °C) viz Obrázek 5, vzorek vyřaďte ze sekvenace.



Obrázek 5: Schéma amplifikace a Melt Peak; oranžově je zvýrazněn negativní vzorek, modře pozitivní vzorky s hodnotami Ct = „N/A“.

- Doporučení 2: V případě, že vzorek vykazuje hodnotu Ct > 10 přidejte dvojnásobek objemu amplikonu 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.

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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 315)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- **315 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 BCR::ABL1 Cancer Kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina®. Naředte custom sekvenační primery R2SP a ISP pufrém 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.

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 pufrém 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. Zředte denaturovaný DNA pool vychlazeným pufrém 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.

Příprava sekvenačních primerů:

- Čistou pasturovou pipetou vyjměte Illumina sekvenační primery pro Read 1 z pozice 12 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 7,5 µl ISP BCR::ABL1 Cancer + 592,5 µl HT1
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 7,5 µl R2SP BCR::ABL1 Cancer + 592,5 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): 6,2 µl ISP BCR::ABL1 Cancer + 813,8 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 28)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 4,6 µl R2SP BCR::ABL1 Cancer + 605,4 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 0,2M 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 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): 15 µl ISP BCR::ABL1 Cancer + 1 985 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 11,3 µl R2SP BCR::ABL1 Cancer + 1 488,7 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): 15 µl ISP BCR::ABL1 Cancer + 1 985 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 15 µl R2SP BCR::ABL1 Cancer + 1 985 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 BCR::ABL1 Extra Sequencing Primers, RDNSP0011A):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 24 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP, pro SP, S1, S2): 26,3 µl ISP BCR::ABL1 Cancer + 3 473,7 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Index sekvenační primery (ISP, pro S4 Novaseq): 37,5 µl ISP BCR::ABL1 Cancer + 4 962,5 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro SP, S1, S2): 15 µl R2SP BCR::ABL1 Cancer + 1 985 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 13)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro S4 Novaseq): 26,3 µl R2SP BCR::ABL1 Cancer + 3 473,7 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.

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 kinázové domény fúzního genu *BCR::ABL1*

Výsledek genotypizace kinázové domény fúzního genu *BCR::ABL1* je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byla detekována varianta v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1* s frekvencí $\geq 5\%$ a zároveň je naměřená frekvence vyšší než vypočtená limitní hodnota pro danou reakci.

Výpočet limitní hodnoty frekvence mutace je nutné provést pro každý vzorek, resp. reakci, zvlášť podle vzorce:

$$LoD_{VAF}[\%] = \frac{50\,000}{(N_{ABL1} \times IS[\%])}$$

- N_{ABL1} je celkový počet molekul obsahující ABL1 doménu (tzn. molekuly obsahující *BCR::ABL1* i molekuly obsahující „ne-fúzní“ *ABL1*) v 5 μ l vzorku vstupujících do reakce preamplifikace.
- IS je hodnota IS naměřená pro daný vzorek (pokud je to např. 0,14 %, do vzorce zadejte hodnotu 0,14).

Použití vzorce – příklad č. 1: V 5 μ l cDNA vzorku bylo naměřeno 25 000 molekul obsahující ABL1 doménu, přičemž hodnota IS byla změřena a vypočtena jako 0,12 %. Po dosazení do vzorce nám vyjde hodnota 16,67 %. To znamená, že detekované mutace v tomto vzorku jsou považovány za

pozitivní v případě $VAF \geq 16,67 \%$. U jakékoli mutace s nižším VAF nemůže být s jistotou rozhodnuto o bezchybné detekci.

Použití vzorce – příklad č. 2: V 5 μ l cDNA vzorku bylo naměřeno 14 000 molekul obsahující ABL1 doménu, přičemž hodnota IS byla změřena a vypočtena jako 0,017 %. Po dosazení do vzorce nám vyjde hodnota 210,08 %. Tato hodnota přesahuje 100 % a tudíž nelze s jistotou určit **žádnou** mutaci s jakoukoli hodnotou VAF. Je to proto, že do reakce nevstupuje dostatečné množství molekul obsahujících gen *BCR::ABL1*.

Aplikaci vzorce na vybrané parametry můžete vidět v příkladové Tabulka 5.

Limitní VAF pro detekci mutace	Hodnota IS pro analyzovaný vzorek							
	1,00 %	0,60 %	0,20 %	0,10 %	0,060 %	0,020 %	0,010 %	0,006 %
Minimální množství ABL1								
6 250	8,00 %	13,33 %	40,00 %	80,00 %	nelze	nelze	nelze	nelze
12 500	4,00 %	6,67 %	20,00 %	40,00 %	66,67 %	nelze	nelze	nelze
25 000	> 2,00 %	3,33 %	10,00 %	20,00 %	33,33 %	100,00 %	nelze	nelze
50 000	> 2,00 %	> 2,00 %	5,00 %	10,00 %	16,67 %	50,00 %	100,00 %	nelze
100 000	> 2,00 %	> 2,00 %	2,50 %	5,00 %	8,33 %	25,00 %	50,00 %	83,33 %
200 000	> 2,00 %	> 2,00 %	> 2,00 %	2,50 %	4,17 %	12,50 %	25,00 %	41,67 %
400 000	> 2,00 %	> 2,00 %	> 2,00 %	> 2,00 %	2,08 %	6,25 %	12,50 %	20,83 %

Tabulka 5: Přehled limitních hodnot VAF pro správnou detekci mutací při daných vstupních parametrech vzorku (aplikace vzorce ze strany 25)

V případě přesně změřené koncentrace molekul fúzního genu *BCR::ABL1* v cDNA vzorku lze použít také alternativní vzorec:

$$LoD_{VAF}[\%] = \frac{500}{N_{BCR::ABL1}}$$

- $N_{BCR::ABL1}$ je celkový počet molekul *BCR::ABL1* v 5 μ l vzorku vstupujících do reakce preamplifikace.

V případě pozitivního nálezu mutace ve fúzním genu *BCR::ABL1* v rozsahu frekvence 1–5 %, lze nález považovat za správně genotypizovaný v případě odpovídajícího výsledku získaného z měření totožného vzorku odlišným Master Mixem (tzn. měřením vzorku v duplikátu, na dvou indexech). Případně doporučujeme vyšetření zopakovat či verifikovat jinou metodou.

Výsledek genotypizace pro **vzorky s velmi nízkou koncentrací cDNA nebo nízkými hodnotami IS či VAF** 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:

- Po **kroku preamplifikace** ověřeno (např. pomocí ELFO), že vzorek obsahuje amplikony o délce cca 1650 bp nebo více v případě jiných zlomů než b2a2 (major) a e1a2 (minor).
- Ve **fastGEN PCR kroku** je detekována s hodnotou minimálně o 3 Ct nižší než NC ($Ct_{PC} + 3 \leq Ct_{NC}$).

Poznámka: V případě, že vzorek nevykazuje amplifikaci (tzn. vykazuje hodnotu Ct = „N/A“), ale zároveň teplota tání PCR produktů odpovídá specifické hodnotě (viz kapitola 12.2.1, Obrázek 5), může jít o přesycenou reakci. Zkontrolujte nastavení vyhodnocení runu a případně zkuste jiné nastavení výpočtu thresholdu pro určení Ct. Pokud však takový vzorek nevykazuje podle analýzy křivek tání specifickou hodnotu T_m ($86 \pm 1,5$ °C), viz Obrázek 5, byla reakce neúspěšná.

- Po vyhodnocení sekvenačních dat vykazuje přítomnost daných variant fúzního genu *BCR::ABL1* v předepsaných frekvencích.

13.3.2 Negativní kontrola musí splňovat následující kritéria:

- Ve **fastGEN PCR kroku** přípravy knihovny není detekována nebo má Ct hodnotu minimálně o 3 Ct vyšší než poslední vzorek/PC. Pokud je rozdíl mezi PC a NC menší než 3 Ct, zařaďte vzorek rovněž do DNA poolu k sekvenaci.
- Po vyhodnocení sekvenačních dat nevykazuje přítomnost variant fúzního genu *BCR::ABL1* nebo nejsou nalezeny žádné specifické produkty vhodné k analýze.

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 BCR::ABL1 Cancer Kit je validována na RNA izolované z plné krve nebo kostní dřeně. Kit pro reverzní transkripci není součástí kitu.
- Pro určení přesného limitu detekce VAF pro měřený vzorek je nutné znát hodnotu IS a koncentraci ABL1 domén či fúzního genu *BCR::ABL1* v daném vzorku.
- Výsledek genotypizace je ovlivněn kvalitou vzorku. Správný postup odběru, transportu, izolace RNA, reverzní transkripce do cDNA a skladování vzorků je pro vyšetření důležitý.
- Výsledky genotypizace by měly být hodnoceny odborným pracovníkem ve zdravotnictví.
- Souprava fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenční knihovny, potřebné pro genotypizaci vybraných kodonů KD fúzního genu *BCR::ABL1* technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů než fúzního genu *BCR::ABL1*, nejsou kitem fastGEN BCR::ABL1 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 ampliconu.
- Výrobce deklaruje pozitivní nález mutací pouze v rozsahu stanoveném v analytické charakteristice soupravy (Tabulka 6). Stanovení dalších mutací nacházejících se ve vybraných oblastech kinázové domény fúzního genu *BCR::ABL1* (viz *Tabulka 1*) je pomocí soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit možné, není však výrobcem deklarováno.
- Za validaci soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit v kombinaci s dalšími produkty a přístroji (např. izolační kit, sekvenátor, software na vyhodnocení dat) při jejich zařazení do diagnostického procesu zodpovídá uživatel soupravy.

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 BCR::ABL1 Cancer Kit firmy BioVendor – Laboratorní medicína s.r.o. byly stanoveny parametry analytické senzitivity a specifity. Pro soupravu byl stanoven limit detekce metody a ověřena křížová reaktivita primerů (*in silico*). Metoda je vysoce citlivá a umožňuje detekci mutací ve frekvenci od 5 % u vzorků s velmi nízkým počtem kopií fúzního genu ($\geq 0,1$ % IS). 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 a syntetických vzorků se známým mutačním statusem. Výsledky stanovení genotypu fúzního genu *BCR::ABL1* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech včetně opakování (senzitivita a specifita 100 %).

V rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit byly validovány mutace v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1*, jejichž souhrn je uveden v Tabulka 6.

Gen	Mutace
ABL1 NM_005157.6	c.730A>G p.(Met244Val)
	c.749G>A p.(Gly250Glu)
	c.757T>C p.(Tyr253His)
	c.763G>A p.(Glu255Gly)
	c.764A>T p.(Glu255Val)
	c.895G>T p.(Val299Leu)
	c.933C>A p.(Phe311Leu)
	c.944C>T p.(Thr315Ile)
	c.1075T>G p.(Phe359Val)
	c.1187A>C p.(His396Pro)
	c.1376A>G p.(Glu459Gly)
	c.1439C>T p.(Pro480Leu)
	c.1520A>G p.(Glu507Gly)
	c.1526A>G p.(Glu509Gly)

Tabulka 6: Seznam validovaných mutací v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1*

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 fúzní gen *BCR::ABL1* s mutacemi), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. Standardní NC by při sekvenaci neměla vykazovat ready v oblasti analyzované soupravou. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

6. Jaký kit použít pro reverzní transkripci?

V rámci vývoje soupravy fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit bylo nejlepších výsledků dosaženo použitím kitu pro reverzní transkripci: SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System, Invitrogen™; Katalogové číslo: 18091050, Thermo Fischer Scientific. Souprava fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit byla však úspěšně testována také s použitím kitu: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™, Katalogové číslo: 4374966, Thermo Fischer Scientific.

7. Jaký je rozsah analyzované oblasti?

Souprava fastGEN BCR::ABL1 Cancer Kit umožňuje analýzu mutací v KD fúzního genu *BCR::ABL1* u transkripčních variant major a minor. Cílené regiony jsou uvedeny v *Tabulka 1*.

8. Co dělat, když ve fastGEN reakci vzorky mají neplatnou hodnotu Ct, i přesto, že vykazují fluorescenční signál?

Může se stát, že při fastGEN reakci budou vzorky nebo pozitivní kontroly vykazovat „N/A“ hodnoty Ct. Pokud však fluorescenční signál takového vzorku dosahuje jednoznačně vyšších hodnot RFU než pozadí runu a křivka teploty tání vykazuje specifické hodnoty T_m ($86 \pm 1,5$ °C), jedná se o „přesycení“ reakce vstupním vzorkem. Signál takového vzorku je už na počátku reakce nad (příp. pod) thresholdem PCR runu a systém jej může chybně vyhodnotit jako negativní. Pro vyhodnocení takových vzorků může pomoci použití regrese namísto thresholdu, ale je stále nutné kontrolovat i křivku tání těchto vzorků.

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

Je možné zakoupit související produkt fastGEN BCR::ABL1 Extra Sequencing Primers RDNSP0011A.

10. Je možné si zvlášť doobjednat preamplifikační Master Mixy?

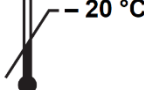
Ano, je možné si zakoupit související produkt fastGEN BCR::ABL1 Extra Preamplification Master Mix pro major i minor zlom RDNSP0011B.

17. REFERENCE

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

- [1] Zhou, T., Medeiros, L.J. & Hu, S. Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. Curr Hematol Malig Rep 13, 435–445 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>.
- [2] Braun, T. P., Eide Ch. A., Druker, B. J., Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. Cancer Cell 37, 530-542 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.006>.

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 s.r.o.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com



FOLLOW US

BIOVENDOR. GROU P