

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN TP53 Cancer 32-kit

Katalogové číslo:
RDNGS0009-32

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)	10
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	11
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	12
12.	POSTUP STANOVENÍ	13
13.	VYHODNOCENÍ	22
14.	LIMITACE SOUPRAVY	24
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	24
16.	ČASTO KLADENÉ DOTAZY	25
17.	REFERENCE	26
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	27

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.001.A	CZE.002.A
V kapitole 8. bylo změněno seřazení složení soupravy v Tabulce 1.	
V kapitole 12.1. změna ilustračního Obrázku 1.	
V kapitole 13. sníženo detekce a vyhodnocení VAF na 3 %.	

1. ÚČEL POUŽITÍ

RDNGS0009-32 fastGEN TP53 Cancer 32-kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *TP53* sekvenováním nové generace (NGS) u obecné populace. Genotypizace pomocí fastGEN TP53 Cancer 32-kit umožňuje analýzu exonů 2–11 a jejich přilehlých intronových oblastí.

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)
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)
<i>TP53</i>	gen kódující tumor supresorový protein p53

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 onkomarkeru *TP53*.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů, a **sekvenační primery**.
- fastGEN TP53 Master Mix je dodáván pro každý vyšetřovaný vzorek ve **2 zkumavkách**.
- Souprava fastGEN TP53 Cancer 32-kit je určena pro vyšetření mutací v genu *TP53* u 32 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN TP53 Cancer 32-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 TP53 Cancer 32-kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN TP53 Cancer 32-kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení Master Mixů.
- Po otevření R2SP TP53 Cancer a ISP TP53 Cancer skladujte komponenty při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sekvenační primery lze použít až 3x.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

GEN *TP53* kóduje nejstudovanější transkripční faktor, tumor supresorový protein p53, který hraje významnou roli v základních biologických procesech včetně buněčného cyklu, odpovědi na poškození DNA, apoptózu a senescenci. Tento gen o velikosti 20 kb (11 exonů) se nachází na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1) a patří mezi nejčastěji mutované geny u různých druhů nádorových onemocnění.

Somatické mutace genu *TP53* se vyskytují u většiny typů lidských nádorů. Nejčastějšími mutacemi jsou „missense“ záměny, které se vyskytují až v 75 % případů. Dalšími možnými změnami jsou inserce a delecce s posunem čtecího rámce (9 %), nonsense mutace (7 %), němé mutace (5 %) a další málo časté mutace. Přibližně 30 % nádorových missense mutací *TP53* představují nukleotidové záměny na vysoce mutabilních CpG dinukleotidech, na kodonech kódujících oblasti nezbytné pro kontakt proteinu p53 se specifickými sekvencemi DNA. Tyto mutace jsou spojeny se ztrátou vazebné aktivity na DNA a transkripční schopnosti.

Z hlediska klinického využití se mutace *TP53* ukázaly jako mimořádně komplexní biomarkery. Analýza mutací genu *TP53* přispívá k lepšímu porozumění podílu mutantních variant genu na onemocnění a měla by pomoci lépe informovat o riziku nádorového onemocnění u jeho nositele.

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 flowcellly

5. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN TP53 Cancer 32-kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření mutačního statusu klinicky relevantního onkomarkeru *TP53* pomocí NGS. Princip stanovení využívá krátkých amplikonů získaných pomocí jediné polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery, kdy dochází k amplifikaci úseků o délce až 260 párů bází a následnému sekvenování o vysokém pokrytí. Použití krátkých amplikonů zvyšuje amplifikovatelnost DNA a diagnostickou výtežnost. Master Mixy dodávané ve formátu k přímému použití umožňují úsporu celkového času na vyšetření a snížení rizika chyby.

Příprava sekvenační knihovny pomocí soupravy fastGEN TP53 Cancer 32-kit vyžaduje pouze přidání izolované DNA ke konkrétnímu Master Mixu a amplifikaci 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 TP53 Cancer 32-kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN TP53 Cancer 32-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 souprav.
- 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 reagent špičky na jedno použití.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

8. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN TP53 Cancer 32-kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 32 vzorků, tj. k provedení 64 reakcí (Tabulka č. 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenční primery** pro gen *TP53*.

Složení soupravy fastGEN TP53 Cancer 32-kit	Sekvence indexů	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
TP53 Master Mix i730 (A-B)	AGACGCGC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i731 (A-B)	CATGGACC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i732e (A-B)	TACCTATT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i733e (A-B)	AGGAGGAT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i734e (A-B)	CTAGCTCG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i735e (A-B)	TAGTATAC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i737e (A-B)	CCCTTGAG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i738e (A-B)	GCATCCTC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i741 (A-B)	CGTTGGTT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i742e (A-B)	TTTTGGCG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i743 (A-B)	GACCAGTT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i744 (A-B)	AAGTTCTT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i745e (A-B)	TCGCAGGC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i746 (A-B)	TCTCTATT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i747 (A-B)	CTACTGGT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i748 (A-B)	AATACGGT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i749e (A-B)	GTGGCATC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i751 (A-B)	CCGGAAGT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i753 (A-B)	GCTTCTCT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i754 (A-B)	AGCGATCT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i755e (A-B)	CGACGCGG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i756e (A-B)	GGCAATCA	18	2	přímé použití

TP53 Master Mix i757 (A-B)	GTACCTTG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i758e (A-B)	AAATTAGC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i761 (A-B)	ATGGTTGG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i762e (A-B)	ACCATCAT	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i763e (A-B)	GACGGTCC	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i764 (A-B)	TTCTTGCG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i765e (A-B)	CACCAGCG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i766e (A-B)	TGGGTAAG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i767 (A-B)	GAGCTACG	18	2	přímé použití
TP53 Master Mix i768 (A-B)	GACTGCAG	18	2	přímé použití
R2SP TP53 Cancer		125	1	k ředění
ISP TP53 Cancer		125	1	k ředění

Tabulka 1: Složení soupravy fastGEN TP53 Cancer 32-kit.

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu *TP53* (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 TP53 Cancer 32-kit: Master Mix

Pro genotypizaci genu *TP53* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek TP53 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 TP53 Cancer
- 1 zkumavku: ISP TP53 Cancer

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 TP53 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 reakce.

Doporučení:

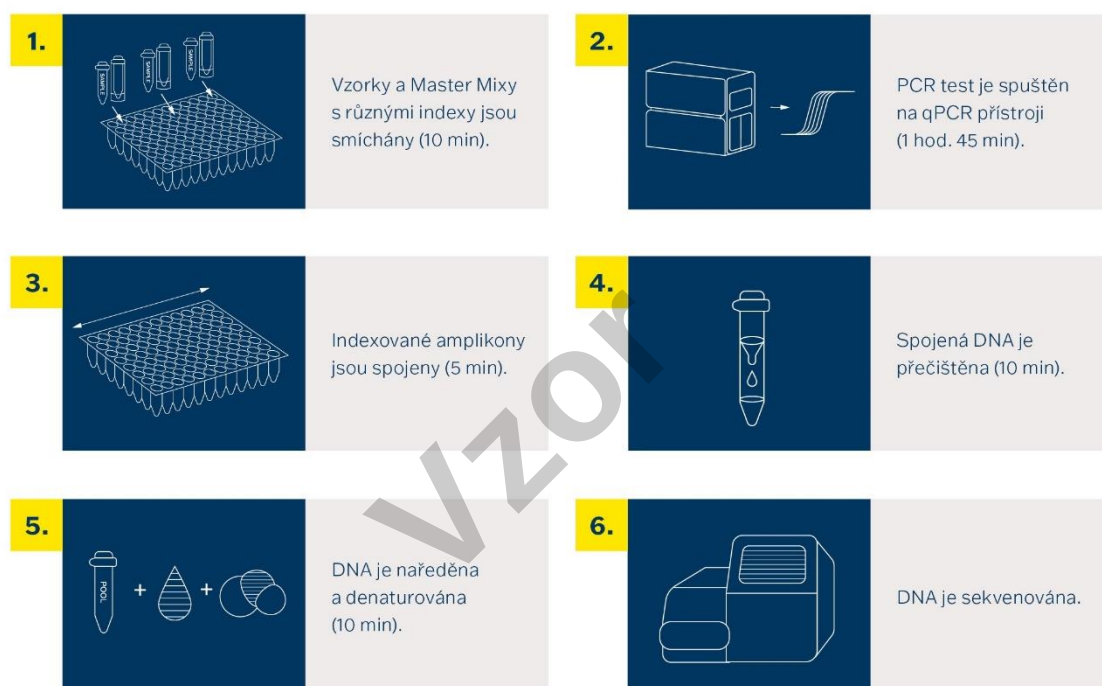
Do každého běhu testování pomocí fastGEN TP53 je doporučeno přidávat **pozitivní kontrolu (PC)**; standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu, není dodáván se soupravou) a **negativní kontrolu (NC)** pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. Při nedodržení 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 3 %.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 32 vzorků pro genotypizaci genu *TP53* v jednom sekvenačním běhu. **Analýza jednoho vzorku probíhá ve dvou oddělených reakcích.**



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 pro Master Mixy A-B daného indexu (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 pro Master Mixy A-B daného indexu (viz kapitola 11).
 - Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu pro Master Mixy A-B daného indexu.

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 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 32.
- 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 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	
melting †		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.
- 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 amplicony krátce zcentrifugujte.
- Pro vytvoření knihovny pro genotypizaci genu *TP53*:
 - Smíchejte jednotlivé amplicony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 8 vzorků smíchejte jednotlivé amplicony v množství 3 μ l PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 48 μ l.
 - 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 $Ct > 36$, 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 amplicony 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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 260)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- **260 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 TP53 Cancer 32-kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina®. Naředte custom sekvenační primery R2SP a ISP puforem 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 puforem 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 200 000 paired-end readů**. Při nastavování runu uveďte délku čtení 151 (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.

Příprava sekvenačních primerů:

- Čistou pasteuřovou pipetou vyjměte Illumina sekvenační primery pro Read 1 z pozice 12 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 20 µl ISP TP53 Cancer + 580 µl HT1
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 20 µl R2SP TP53 Cancer + 580 µl HT1

Pipetujte 600 µl naředěné 10 pM 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. Zřed'te denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 5 pM. Následně nařed'te 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): 24,6 µl ISP TP53 Cancer + 795,4 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 28)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 18,3 µl R2SP TP53 Cancer + 591,7 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 25)

Pipetujte 500 µl naředěné 1,4 pM nebo 1,6 pM 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. Zřed'te denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 20 pM. Následně nařed'te 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): 60 µl ISP TP53 Cancer + 1 940 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 45 µl R2SP TP53 Cancer + 1 455 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): 60 µl ISP TP53 Cancer + 1 940 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 60 µl R2SP TP53 Cancer + 1 940 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 21)

Pipetujte 1 300 µl naředěné 1,5 pM nebo 1,8 pM 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 0,2–1 % 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 TP53 Extra Sequencing Primers, RDNSP0009A):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 24 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP, pro SP, S1, S2): 105 µl ISP TP53 Cancer + 3 395 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Index sekvenační primery (ISP, pro S4 Novaseq): 150 µl ISP TP53 Cancer + 4 850 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro SP, S1, S2): 60 µl R2SP TP53 Cancer + 1 940 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 13)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro S4 Novaseq): 105 µl R2SP TP53 Cancer + 3 395 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 – SP, S1, S2;
3 500 µl 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 *TP53*

Výsledek genotypizace ***TP53*** je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byla detekována varianta genu *TP53* s frekvencí ≥ 3 %.

V případě pozitivního nálezu mutace v genu *TP53* v rozsahu frekvence 1–3 % 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 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 genu *TP53* 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 TP53 Cancer 32-kit je validována na DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích, kostní dřeně nebo 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 TP53 Cancer 32-kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenční knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *TP53* technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů než genu *TP53*, nejsou kitem fastGEN TP53 Cancer 32-kit zjištěitelné.
- 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.

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 TP53 Cancer 32-kit firmy BioVendor – Laboratorní medicína a.s. 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 statutem. Výsledky stanovení genotypu genu *TP53* 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 200 000 paired-end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má 2 mil paired-end readů, je dostačující až pro 8 vzorků. MiSeq Reagent kit v2 Micro, který má 8 mil paired-end readů je při sekvenaci 32 vzorků zaplněn z 80 %.

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. Rozsah analyzované oblasti

Souprava fastGEN TP53 Cancer 32-kit umožňuje analýzu exonů 2–11 a jejich přilehlých intronových oblastí. Genotypizace exonů 9β a 9γ vzniklých alternativním sestřihem je proveditelná, není však výrobcem deklarována.

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

Je možné zakoupit související produkt fastGEN TP53 Extra Sequencing Primers RDNSP0009A.

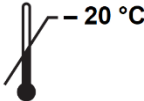
17. REFERENCE

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

- [1] Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P., 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), p.a001008.
- [2] Zhu, G., Pan, C., Bei, J.X., Li, B., Liang, C., Xu, Y. and Fu, X., 2020. Mutant p53 in cancer progression and targeted therapies. *Frontiers in oncology*, 10, p.595187.

Vzor

18. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použít do data
	Horní mez teploty
	Výrobce
 www.biovendor.com	Čtěte elektronický návod k použití
 32	Obsah postačuje pro 32 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