

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN Food Intolerance Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0018

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.	URČENÝ ÚČEL	4
2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	5
3.	SKLADOVÁNÍ	5
4.	ÚVOD	6
5.	PRINCIP STANOVENÍ	7
6.	UPOZORNĚNÍ	7
7.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	8
8.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	9
9.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	10
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	11
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	12
12.	POSTUP STANOVENÍ	13
13.	VYHODNOCENÍ	21
14.	LIMITACE SOUPRAVY	24
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	24
16.	ČASTO Kladené DOTAZY	25
17.	REFERENCE	27
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	28

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.002.A	CZE.003.A
Změna názvu kitu v celé dokumentaci.	
Úprava výčtu měřených oblastí (vyřazení rs370793608).	
V kapitole 12. přidána informace o limitu detekce.	
V kapitole 12.1.3 volitelný krok měření křivky tání změněn na doporučený.	
V kapitolách 12.3.4 a 16. změněna hodnota doporučených readů na 50 000 na vzorek.	
V kapitolách 12.3.5, 12.3.6, 12.3.7, 12.3.8 změna objemu sekvenačních primerů.	
V kapitole 16. přidána informace o hodnocení hodnot T_m v kroku qPCR.	

VZOR

1. URČENÝ ÚČEL

RDNGS0018 fastGEN Food Intolerance Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebnou pro genotypizaci oblastí rs118204429, rs764826805, rs387906225, rs1800546, rs76917243, rs78340951, rs77718928 v genu *ALDOB*, oblastí rs10156191, rs1049742, rs2268999, rs1049793, rs2052129 v genu *AOC1* a oblastí rs4988235, rs182549 v genu *MCM6* sekvenováním nové generace (NGS).

Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.

1.1 Použité zkratky

<i>ALDOB</i>	gen pro Aldolázu B
<i>AOC1</i>	gen pro Diaminooxidázu (Amine oxidase copper-containing 1)
Ct	číslo cyklu (Cycle Threshold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/ Asymmetrical Cyanine Dye
LoD	limit detekce (Limit of Detection)
<i>MCM6</i>	gen pro Minichromosome maintenance complex component 6
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)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single-Nucleotide Polymorphism)
VAF	frekvence variantní alely (Variant Allele Frequency)

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 vybraných oblastí významných pro geny *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6*.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů, **a sekvenační primery**.
- Souprava fastGEN Food Intolerance Kit je určena pro vyšetření celkem 15 vybraných oblastí v genech *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6* u 16 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN Food Intolerance 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 Food Intolerance Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN Food Intolerance Kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení Master Mixů.
- Po otevření R2SP Food Intolerance a ISP Food Intolerance skladujte komponenty při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sekvenační primery lze použít až 3x.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

Potravinové intolerance mohou způsobovat řadu nepříjemných příznaků, včetně trávicích potíží, kožních vyrážek, bolestí hlavy a dalších zdravotních problémů. Včasná detekce a správná diagnóza těchto intolerancí je klíčová pro zlepšení kvality života postižených jedinců a pro navržení vhodného dietního režimu.

Intolerance fruktózy je neschopnost těla správně metabolizovat fruktózu, cukr, který se nachází v mnoha druzích ovoce a některých sladidlech. Existují dvě hlavní formy: vrozená fruktózová intolerance, způsobená genetickým deficitem enzymu aldolázy B, a malabsorpce fruktózy, kde je problém s transportem fruktózy ve střevě. Vyšetřované genetické varianty: **rs118204429, rs387906225, rs1800546, rs76917243, rs78340951, rs77718928, rs764826805.**

Intolerance histaminu vzniká, když tělo nemůže účinně odbourávat histamin, látku přirozeně se vyskytující v některých potravinách. Histamin je biogenní amin, který se podílí na řadě fyziologických procesů, včetně zánětlivých reakcí. Vyšetřované genetické varianty: **rs10156191, rs1049742, rs2268999, rs1049793, rs2052129.**

Intolerance laktózy je neschopnost trávit laktózu, cukr obsažený v mléce a mléčných výrobcích. Tento stav je způsoben nedostatkem enzymu laktázy, který je nezbytný pro rozklad laktózy na glukózu a galaktózu. Gen *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6) hraje klíčovou roli v regulaci exprese genu *LCT* (laktáza), a tím i ve schopnosti trávit laktózu. Vyšetřované genetické varianty: **rs4988235, rs182549.**

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 Food Intolerance Kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření genetických variant spojených s intolerancí fruktózy (*ALDOB*), histaminu (*AOC1*) a laktózy (*MCM6*) pomocí NGS. Princip stanovení využívá krátkých amplikonů získaných pomocí jediné polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery, kdy dochází k amplifikaci úseků o průměrné délce 243 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 Food Intolerance 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 Food Intolerance Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN Food Intolerance 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.

VZOR

8. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN Food Intolerance Kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 16 vzorků (Tabulka 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** pro geny *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6*.

Složení soupravy fastGEN Food Intolerance Kit	Sekvence indexů	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
Food Intolerance Master Mix i732	CCTATTAC	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i733	GAGGATAC	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i734	AGCTCGAC	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i735	GTATACCA	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i737	CTTGAGAA	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i738	ATCCTCAA	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i742	TTGGCGTT	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i745	GCAGGCTT	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i755	ACGCGGAT	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i756	CAATCAAT	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i758	ATTAGCTG	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i759	CGAATATG	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i762	CATCATGG	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i763	CGGTCCGG	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i765	CCAGCGCG	18	1	přímé použití
Food Intolerance Master Mix i766	GGTAAGCG	18	1	přímé použití
R2SP Food Intolerance		55	1	k ředění
ISP Food Intolerance		55	1	k ředění

Tabulka 1: Složení soupravy fastGEN Food Intolerance Kit

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6* (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 Food Intolerance Kit: Master Mix

Pro genotypizaci genů *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6* 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 Food Intolerance
- 1 zkumavku: ISP Food Intolerance

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 Tabulka 2.
- Příliš koncentrovaná DNA může vést k inhibičním jevům PCR a nesprávným výsledkům. Vzorky o velmi nízké koncentraci DNA neřeďte 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 Tabulka 2.

Vzorek naředěný na vhodnou koncentraci je **připraven k analýze**. Pokračujte dle kapitoly 12. Postup stanovení.

	Koncentrace Qubit HS	Ředění	Postup ředění
A	>10 ng/µl	5 x	1 µl DNA + 4 µl H ₂ O
B	1–10 ng/µl	bez ředění	5 µl DNA

Tabulka 2: Stanovení vhodného ředění DNA do PCR reakce

Doporučení:

Do každého běhu testování pomocí fastGEN Food Intolerance 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.

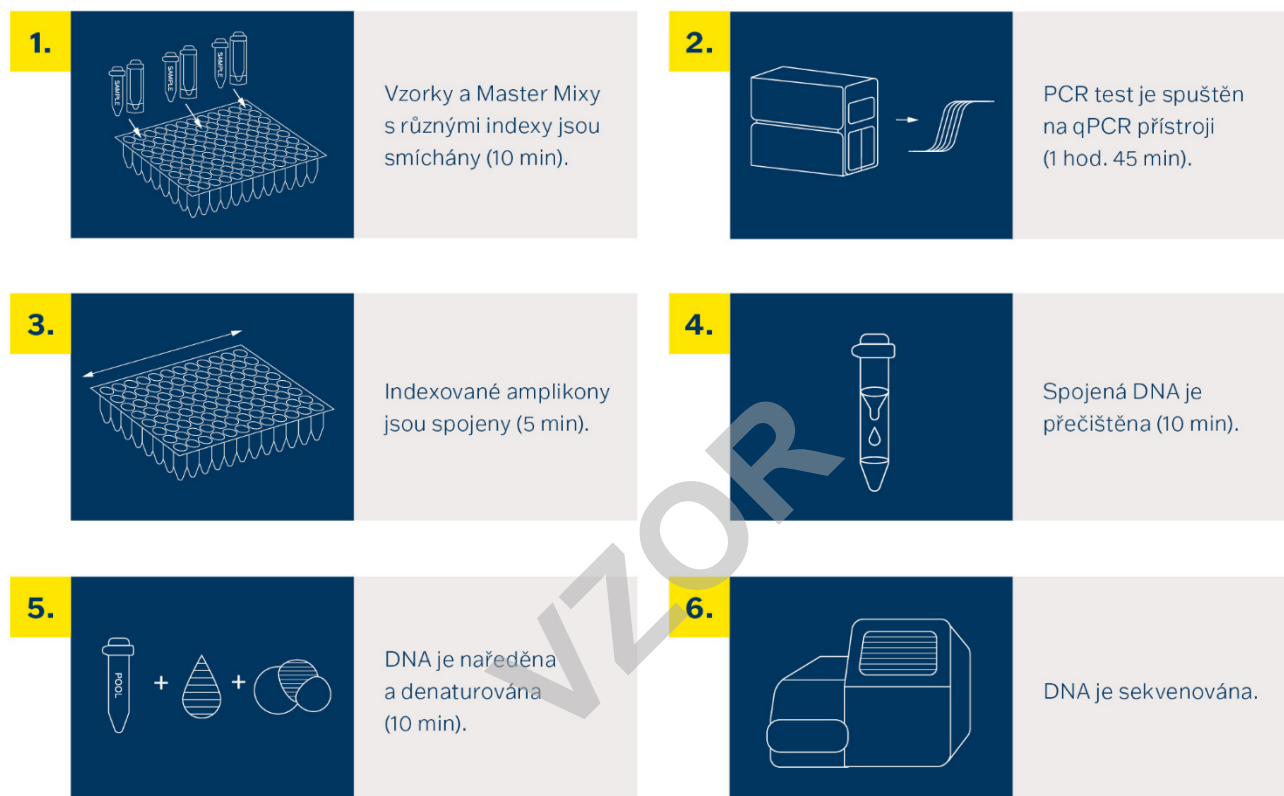
Při nevhodné manipulaci může dojít ke kontaminaci testu a falešně pozitivním výsledkům.

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. Minimální vstup do reakce je 5 ng DNA.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 16 vzorků pro genotypizaci genů *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6* 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 Tabulka 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 cycles
	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 termocyklu.
- Spustte 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 ampikonů 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 ampikony a DNA pool na ledu.**

12.2.1 Spojení ampikonů v DNA pool

- Po ukončení qPCR amplifikace zkumavky s ampikony krátce zcentrifugujte.
- Pro vytvoření knihovny pro genotypizaci genů *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6*:
 - Smíchejte jednotlivé ampikony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 16 vzorků smíchejte jednotlivé ampikony 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 > 33 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 ampikony 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:

$$c[nM] = \frac{\rho i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 243)}$$

- ρi je hmotnostní koncentrace DNA
- **243 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 Food Intolerance Kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina®. Nařed'te custom sekvenační primery R2SP a ISP puřrem 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 puřru příslušný Illumina sekvenační primer. **Pro Read 1 použijte Illumina® sekvenační primery.** Uved'te použití custom pozic v SampleSheetu a v nastavení přístroje.

12.3.3 Ředění a denaturace DNA poolu

Nařed'te purifikovaný DNA pool na požadovanou koncentraci dle doporučení Illumina® a dle používaného sekvenátoru.

Proved'te denaturaci vhodně naředěného DNA poolu NaOH. Vždy je nutné připravit čerstvý roztok NaOH. Zřed'te 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 spus'te sekvenační program (software od Illumina®). Postupujte podle pokynů výrobce přístroje.

Na jeden vzorek je potřeba **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 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): 12 µl ISP Food Intolerance + 588 µl HT1
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 12 µl R2SP Food Intolerance + 588 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): 9,8 µl ISP Food Intolerance + 810,2 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 28)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 7,4 µl R2SP Food Intolerance + 602,6 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 ke 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): 24 µl ISP Food Intolerance + 1976 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)

Read2 sekvenační primery (R2SP): 18 µl R2SP Food Intolerance + 1482 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): 24 µl ISP Food Intolerance + 1976 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 24 µl R2SP Food Intolerance + 1976 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 Food Intolerance Extra Sequencing Primers, RDNSP0018A):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 24 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP, pro SP, S1, S2): 42 µl ISP Food Intolerance + 3 458 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Index sekvenační primery (ISP, pro S4 Novaseq): 60 µl ISP Food Intolerance + 4 940 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro SP, S1, S2): 24 µl R2SP Food Intolerance + 1 976 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 13)

- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro S4 Novaseq): 42 µl R2SP Food Intolerance + 3 458 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 *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6*

Výsledek genotypizace ***ALDOB*** a ***AOC1*** a ***MCM6*** je považován za pozitivní, pokud byla varianta v některé z oblastí rs118204429, rs764826805, rs387906225, rs1800546, rs76917243, rs78340951, rs77718928 v genu *ALDOB*, oblastí rs10156191, rs1049742, rs2268999, rs1049793, rs2052129 v genu *AOC1* a oblastí rs4988235, rs182549 v genu *MCM6* detekována s frekvencí $\geq 30\%$.

POZOR! Vzhledem k tomu, že se laktózová intolerance v oblastech rs4988235, rs182549 v genu *MCM6* projevuje u alely vedené v referenčním genomu GRCh38, výskyt variantní alely značí zdravého jedince. U pacienta trpícího laktózovou intolerancí bude hodnota VAF $< 1\%$ a tím pádem se v GENOVESA v soupisu variant nevypisuje!

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.

Soupis variant a jejich hodnocení

Gen	Oblast (dbSNP)	HGVSc [GRCh38] (orientace dle genu)	Referenční alela v reportu (orientace ref. genomu = plus)	Alela snižující produkci enzymu (orientace ref. genomu = plus)	Varianta intolerance (orientace ref. genomu = plus)
ALDOB	rs118204429	c.178C>T / C>A	G	A / T	GA / AA / GT / TT
ALDOB	rs764826805	c.324+1G>A	C	T	CT / TT
ALDOB	rs387906225	c.360_363del / dup	TTTG	del / dup TTTG*	dup. nebo del. v oblasti delTTTG / dupTTTG*
ALDOB	rs1800546	c.448G>C / G>A	C	G / T	CG / GG / CT / TT
ALDOB	rs76917243	c.524C>A	G	T	GT / TT
ALDOB	rs78340951	c.1005C>G / C>T	G	C / A	CG / CC / GA / AA
ALDOB	rs77718928	c.1013C>T / C>G / C>A	G	A / C / T	GA / AA / CG / CC / GT / TT
AOC1	rs10156191	c.47C>T	C	T	CT / TT
AOC1	rs1049742	c.995C>T	C	T	CT / TT
AOC1	rs2268999	c.-16-578A>T	A	T	AT / TT
AOC1	rs1049793	c.1933C>G / C>T	C	G / T	CG / GG / CT / TT
AOC1	rs2052129	g.150851884G>A / G>T (GRCh38.p14 chr 7)	G	A / T	GT / TT / GA / AA
MCM6	rs4988235	c.1917+326C>T / C>G / C>A	G	G	GG
MCM6	rs182549	c.1362+117G>A	C	C	CC

Tabulka 4: Soupis referenčních a možných variant pro vybrané oblasti (*pro rozlišení duplikací i delecí, jsou do analýzy zahrnuty také okolní nukleotidy).

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 *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6* 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 je rozdíl mezi PC a NC menší než 3 Ct, zařadte vzorek rovněž do DNA poolu k sekvenaci.

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.

VZOR

14. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN Food Intolerance Kit je validována na DNA izolované z bukalního stěru, plné krve a syntetické DNA.
- 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 Food Intolerance Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenční knihovny, potřebné pro genotypizaci oblastí rs118204429, rs764826805, rs387906225, rs1800546, rs76917243, rs78340951, rs77718928 v genu *ALDOB*, oblastí rs10156191, rs1049742, rs2268999, rs1049793, rs2052129 v genu *AOC1* a oblastí rs4988235, rs182549 v genu *MCM6* technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů, nejsou kitem fastGEN Food Intolerance 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 Food Intolerance 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*). 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 genů *ALDOB*, *AOC1* a *MCM6* 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?

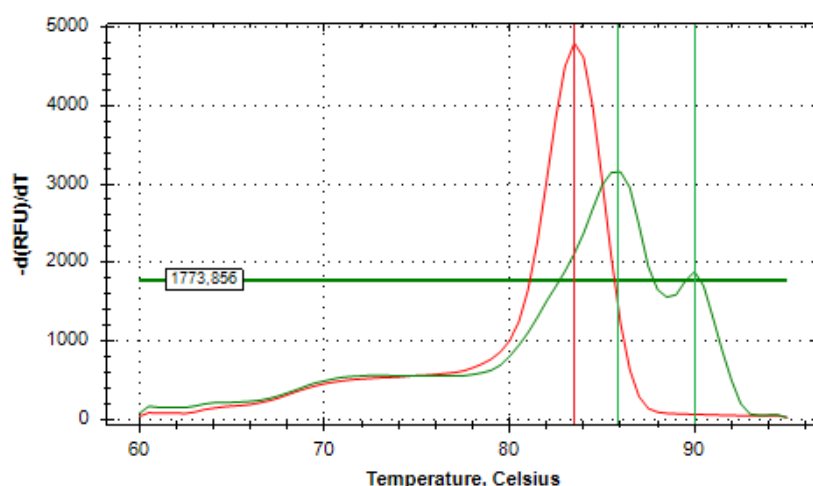
Pro sekvenování knihoven připravených pomocí souprav fastGEN jsou vhodné sekvenátory značky Illumina®.

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. V případě zahrnutí kroku pro výpočet křivky tání produktů PCR v závěru qPCR protokolu amplifikace (viz kapitola 12.1.3) má křivka tání pro PC specifický průběh se dvěma vrcholy a vykazuje hodnotu T_{m1} minimálně o 1 °C vyšší než hodnota T_m pro NC (pokud je přítomna); hodnota T_{m2} má však výrazně slabší signál a může být tedy pod hraniční hodnotou pro hodnocení (viz Obrázek 2: Vyobrazení hodnot T_m naměřených z křivky tání (PC = zelená, NC = červená)).



Obrázek 2: Vyobrazení hodnot T_m naměřených z křivky tání (PC = zelená, NC = červená).

Doporučujeme ověřit kvalitu a správný typ použité PC (musí obsahovat mutace v cílových oblastech zmiňovaných genů), 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 kitem. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

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

Je možné zakoupit související produkt fastGEN Food Intolerance Extra Sequencing Primers RDNSP0018A.

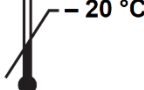
VZOR

17. REFERENCE

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

- [1] ANGUITA-RUIZ, Augusto; AGUILERA, Concepción M.; GIL, Ángel. Genetics of lactose intolerance: an updated review and online interactive world maps of phenotype and genotype frequencies. *Nutrients*, 2020, 12.9: 2689.
- [2] Gaughan S, Ayres L, Baker PR II. Hereditary Fructose Intolerance. In: *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA); 1993. PMID: 26677512.
- [3] COMAS-BASTÉ, Oriol, et al. Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules*, 2020, 10.8: 1181.
- [4] MAINTZ, L., et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy*, 2011, 66.7: 893-902.
- [5] GAUGHAN, Sommer; AYRES, Lachlan; BAKER, Peter R. Hereditary fructose intolerance. 2021.
- [6] SINGH, Sumit Kumar; SARMA, Moinak Sen. Hereditary fructose intolerance: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 2022, 11.4: 321.

18. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použít do data
	Horní mez teploty
	Výrobce
 www.biovendor.com	Čtěte elektronický návod k použití
 16	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