

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN MSI Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0019

Pouze pro výzkumné účely



**BioVendor
R&D®**



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com

1.	ÚČEL POUŽITÍ	3
2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	4
3.	SKLADOVÁNÍ	4
4.	ÚVOD	5
5.	PRINCIP STANOVENÍ	6
6.	UPOZORNĚNÍ	6
7.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	7
8.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	8
9.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	9
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	10
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	11
12.	POSTUP STANOVENÍ	12
13.	VYHODNOCENÍ	20
14.	LIMITACE SOUPRAVY	22
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	22
16.	ČASTO KLADENÉ DOTAZY	23
17.	REFERENCE	26
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	27

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.001.A	CZE.002.A
Kap. 8: Úprava Tabulky 1.	

1. ÚČEL POUŽITÍ

RDNGS0019 fastGEN MSI Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro vyšetření mikrosatelitní nestability klinicky relevantních regionů pomocí sekvenování nové generace (NGS) u obecné populace. fastGEN MSI Kit umožňuje analýzu mikrosatelitních regionů BAT-25, BAT-26, BAT-40, CAT-25, NR-21, NR-22, NR-24, NR-27, MONO-27, TGFBR11, D2S123 a D18S58.

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)
MSI	mikrosatelitní nestabilita (Microsatellite Instability)
MSI-H	mikrosatelitní nestabilita – vysoká (Microsatellite Instability – High)
MSI-L	mikrosatelitní nestabilita – nízká (Microsatellite Instability – Low)
MSS	mikrosatelitní stabilita (Microsatellite Stability)
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)

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 vyšetření mikrosatelitní nestability u mikrosatelitních regionů.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů, a **sekvenační primery**.
- fastGEN MSI Master Mix je dodáván pro každý vyšetřovaný vzorek ve **2 zkumavkách**.
- Souprava fastGEN MSI Kit je určena pro vyšetření delecí anebo inzercí v mikrosatelitních regionech u 16 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN MSI 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 MSI Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN MSI Kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení Master Mixů.
- Po otevření R2SP MSI a ISP MSI skladujte komponenty při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sekvenační primery lze použít až 3x.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

Mikrosatelity jsou krátké opakující se sekvence nukleotidů, které se v DNA vyskytují v repetících. Mikrosatelitní nestabilita (MSI) je definována změnami délky mikrosatelitů, tj. změnami počtů repetic. Tyto změny jsou způsobené neschopností DNA opravného systému opravit chybu v sekvenci a chyby se pak v genomu hromadí. Inzerce a delece vznikají důsledkem genomické nestability jako doprovodný jev nádorového onemocnění, a proto je mikrosatelitní nestabilita důležitým markerem pro výskyt a sledování vývoje tumorů. Mezi onemocnění spojené s MSI-H statusem patří Lynchův syndrom a nádorová onemocnění – kolorekta, žaludku, prsu, prostaty, žlučníku, ovarií, endometria, pankreatu. Mikrosatelitní nestabilita slouží také jako prediktivní marker pro léčbu nádorových onemocnění pomocí imunoterapie.

Při detekci MSI je možné určit 3 různé statusy – vysoká nestabilita (MSI-H), nízká nestabilita (MSI-L) a mikrosatelitní stabilita (MSS). Tyto statusy jsou určeny pomocí bioinformatické analýzy klinicky relevantních regionů.

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

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

- cílovou sekvenci pro účely vyšetření mikrosatelitní nestability (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 MSI Kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření mikrosatelitní nestability klinicky relevantních regionů 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 240 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 MSI 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 MSI Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN MSI 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.
- Nekombinujte reagenty ze souprav různých výrobních šarží.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

8. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN MSI Kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 16 vzorků, tj. k provedení 32 reakcí (Tabulka č. 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** pro mikrosatelitní regiony.

Složení soupravy fastGEN MSI Kit	Sekvence indexů P7	Sekvence indexů P5	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
MSI Master Mix A29 (A-B)	CATCATGG	TCGTCGGC	18	2	přímé použití
MSI Master Mix A30 (A-B)	CGGTCCGG	TCGTCGGC	18	2	přímé použití
MSI Master Mix A31 (A-B)	CCAGCGCG	TCGTCGGC	18	2	přímé použití
MSI Master Mix A32 (A-B)	GGTAAGCG	TCGTCGGC	18	2	přímé použití
MSI Master Mix B29 (A-B)	CATCATGG	CTCAGACG	18	2	přímé použití
MSI Master Mix B30 (A-B)	CGGTCCGG	CTCAGACG	18	2	přímé použití
MSI Master Mix B31 (A-B)	CCAGCGCG	CTCAGACG	18	2	přímé použití
MSI Master Mix B32 (A-B)	GGTAAGCG	CTCAGACG	18	2	přímé použití
MSI Master Mix C29 (A-B)	CATCATGG	GAGCTCGT	18	2	přímé použití
MSI Master Mix C30 (A-B)	CGGTCCGG	GAGCTCGT	18	2	přímé použití
MSI Master Mix C31 (A-B)	CCAGCGCG	GAGCTCGT	18	2	přímé použití
MSI Master Mix C32 (A-B)	GGTAAGCG	GAGCTCGT	18	2	přímé použití
MSI Master Mix D29 (A-B)	CATCATGG	TCTGAGTA	18	2	přímé použití
MSI Master Mix D30 (A-B)	CGGTCCGG	TCTGAGTA	18	2	přímé použití
MSI Master Mix D31 (A-B)	CCAGCGCG	TCTGAGTA	18	2	přímé použití
MSI Master Mix D32 (A-B)	GGTAAGCG	TCTGAGTA	18	2	přímé použití
R2SP MSI			85	1	k ředění
ISP MSI			85	1	k ředění

Tabulka 1: Složení soupravy fastGEN MSI Kit

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované mikrosatelitně nestabilní regiony (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 MSI Kit: Master Mix

Pro vyšetření mikrosatelitní nestability nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek MSI 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 MSI
- 1 zkumavku: ISP MSI

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 MSI 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:

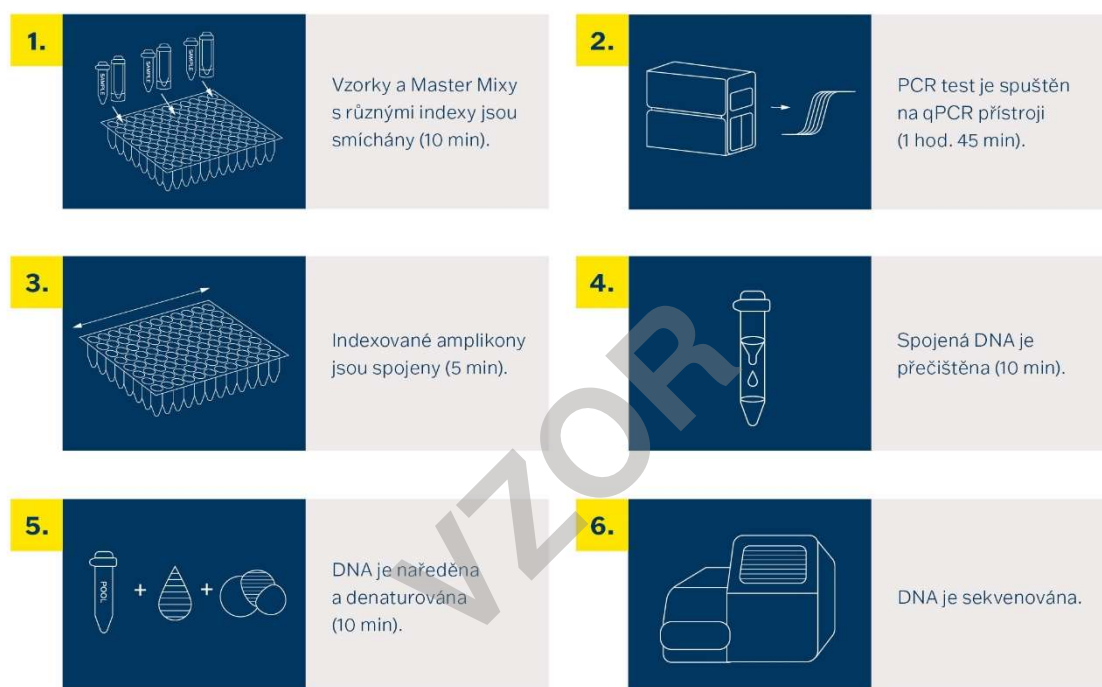
Do každého běhu testování pomocí fastGEN MSI je doporučeno přidávat **pozitivní kontrolu (PC)**; standardizovaný vzorek obsahující požadované mikrosatelitně nestabilní regiony, není dodáván se soupravou) a **negativní kontrolu (NC)** pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. Při 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.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 16 vzorků pro vyšetření mikrosatelitní nestability 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 16.
- Jednotlivé Master Mixy otvírejte postupně a vždy těsně před přidáním do reakce, poté ihned uzavřete. Zabraňte současnému otevírání více Master Mixů, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci.
- Zalepte PCR desku lepicí fólií nebo uzavřete mikrozskumavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280 x g).

12.1.3 qPCR

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

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

Krok	Čas	Teplota	
denaturace	2 min	95 °C	
amplifikační cyklus	15 s	95 °C	40 cyklů
	30 s	62 °C	
	30 s	72 °C*	
finální elongace	5 min	72 °C	
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 amplikony krátce zcentrifugujte.
- Pro vytvoření knihovny pro vyšetření mikrosatelitní nestability:
 - Smíchejte jednotlivé amplikony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 8 vzorků smíchejte jednotlivé amplikony 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: V případě, že vzorek vykazuje hodnotu $C_t > 31$ přidejte dvojnásobek, ev. pro $C_t > 34$ trojnásobek objemu ampliconu do DNA poolu. V případě, že vzorek vykazuje hodnotu $C_t > 36$, 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 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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 240)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- **240 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 MSI 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 **100 000 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 pufr 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 pasteuovou pipetou vyjměte Illumina sekvenační primery pro Read 1 z pozice 12 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP): 19,5 µl ISP MSI + 581 µl HT1
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 19,5 µl R2SP MSI + 581 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): 16 µl ISP MSI + 804 µl HT1 nebo Illumina® sekvenačních primerů (pozice 28)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 11,9 µl R2SP MSI + 598 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. 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): 39 µl ISP MSI + 1 961 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 29,3 µl R2SP MSI + 1 471 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): 39 µl ISP MSI + 1 961 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 22)
- Read2 sekvenační primery (R2SP): 39 µl R2SP MSI + 1 961 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 k 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 MSI Extra Sequencing Primers, RDNSP0019A):

- Vyjměte Illumina® sekvenační primery pro Read 1 z pozice 24 do čisté zkumavky
- Index sekvenační primery (ISP, pro SP, S1, S2): 68 µl ISP MSI + 3 432 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Index sekvenační primery (ISP, pro S4 Novaseq): 100 µl ISP MSI + 4 900 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 23)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro SP, S1, S2): 39 µl R2SP MSI + 1 961 µl Illumina® sekvenačních primerů (pozice 13)
- Read2 sekvenační primery (R2SP, pro S4 Novaseq): 68 µl R2SP MSI + 3 432 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.

13. VYHODNOCENÍ

Minimální sekvenační pokrytí pro mikrosatelitní regiony je 100 readů.

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 Vyšetření mikrosatelitní nestability

Výsledek vyšetření mikrosatelitní nestability je považovaný za **pozitivní** (status MSI-H), pokud bylo **více než 30 % z detekovaných regionů nestabilních**.

Výsledek 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

Výsledek vyšetření mikrosatelitní nestability je považovaný za **negativní** (status MSS), pokud bylo **méně než 15 % z detekovaných regionů nestabilních**.

Za klinicky **negativní** výsledek je také považován status MSI-L, kdy je počet detekovaných nestabilních regionů v rozmezí **15–30 %**.

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 je kontrola vyhodnocena se statusem MSI-H.

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.

14. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN MSI Kit je validována na DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích.
- Výsledek genotypizace je ovlivněn kvalitou vzorku. Správný postup odběru, transportu, izolace DNA a skladování vzorků je pro vyšetření důležitý.
- Výsledky genotypizace by měly být hodnoceny odborným pracovníkem ve zdravotnictví.
- Souprava fastGEN MSI Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné k vyšetření mikrosatelitní nestability klinicky relevantních mikrosatelitních regionů technologií NGS.
- Sekvenční varianty jsou detekovány jenom u uvedených mikrosatelitních regionů, varianty u jiných oblastí nejsou kitem fastGEN MSI Kit zjistitelné.
- Negativní výsledek nevylučuje změny délky sekvence 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.
- Minimální sekvenační pokrytí regionu BAT-26 je 30 readů.

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 MSI 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 mikrosatelitní nestability 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 100 000 paired-end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má 2 mil paired-end readů, je dostačující až pro 16 vzorků. MiSeq Reagent kit v2 Micro, který má 8 mil paired-end readů, je ze 20 % plný při sekvenaci 16 vzorků.

2. Lze použít i jiný nástroj na analýzu dat?

Ano, na sekundární analýzu dat je možné použít např. CLC Genomics Workbench nebo MSIsensor-pro.

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 (status MSI), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. Pokud je rozdíl mezi PC a NC menší než 3 Ct, doporučujeme NC sekvenovat. Standardní NC by při sekvenaci neměla vykazovat ready v oblasti analyzované kitem. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

6. Rozsah analyzované oblasti

Souprava fastGEN MSI Kit umožňuje analýzu 12 mikrosatelitních regionů – BAT-25, BAT-26, BAT-40, CAT-25, NR-21, NR-22, NR-24, NR-27, MONO-27, TGFBR1, D2S123 a D18S58. Vyšetření mikrosatelitní nestability u regionu D5S346 je proveditelné, ale není zahrnuto ve vyhodnocení pomocí softwaru GENOVESA a proto není výrobcem deklarováno.

7. Počet celkově detekovaných regionů

V případě 6 a méně detekovaných regionů je doporučeno vyšetření zopakovat nebo verifikovat jinou metodou.

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

Je možné zakoupit související produkt fastGEN MSI Extra Sequencing Primers RDNSP0019A.

9. Jaká je délka detekovaných mikrosatelitních regionů?

Označení mikrosatelitního regionu	Detekovaná délka mikrosatelitního regionu*	Repetitivní jednotka
BAT-40	36	T
MONO-27	27	T
BAT-26	27	A
D2S123	21	AC
NR-24	23	T
TGFBRII	10	A
BAT-25	24	T
CAT-25	25	T
NR-27	26	A
NR-22	21	T
NR-21	21	A
D18S58	18	GT

Tabulka 4: Délka repetitivních jednotek detekovaná u mikrosatelitních regionů obsažených v kitu fastGEN MSI (*medián detekován u stabilních vzorků)

10. Jak se vyhodnocuje nestabilní a stabilní mikrosatelitní region?

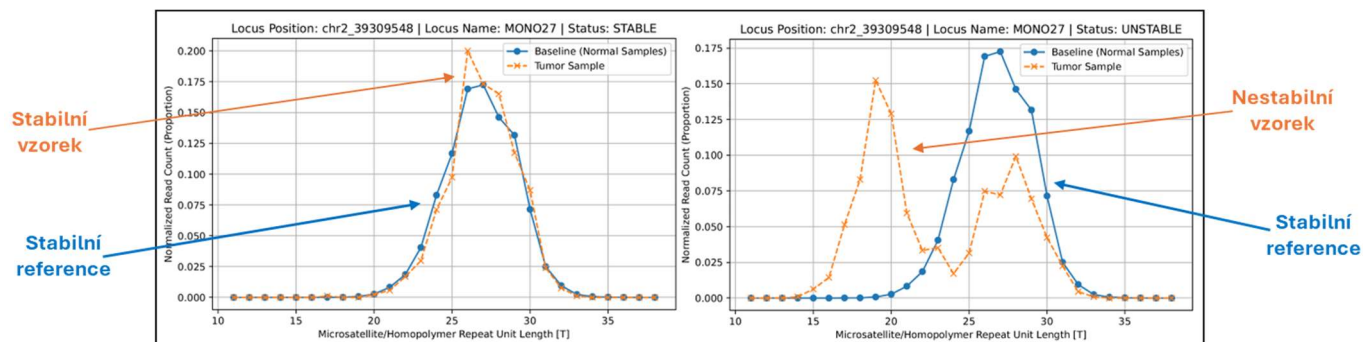
Nestabilita je definovaná jako změna počtu repetitivních jednotek projevující se zkrácením nebo prodloužením. Délka mikrosatelitních regionů pacienta se porovnává s délkou regionů u baseline. Status regionu je interpretovaný algoritmem na základě hodnot tvořících baseline.

11. Co je baseline?

Baseline je hodnota stabilních repetitivních jednotek zobrazených do grafu. Je vytvořena ze **stabilních vzorků kolorektálního karcinomu a karcinomu endometria.**

12. Jak interpretovat vizualizaci mikrosatelitních regionů?

V grafu je důležitá délka mikrosatelitního regionu zaznamenána na ose X pro konkrétní repetitivní jednotku (uvedena v tab. v otázce č. 9). Osa Y znázorňuje normalizovaný počet kopií DNA konkrétního regionu. Stabilní mikrosatelitní region tvarem kopíruje tvar stabilní reference – baseline. Nestabilní region se vyznačuje posunem na ose X, tzn. zkrácením nebo prodloužením mikrosatelitního regionu.



Obrázek 2: Příklad vizualizace stabilního a nestabilního regionu MONO-27

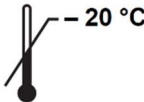
17. REFERENCE

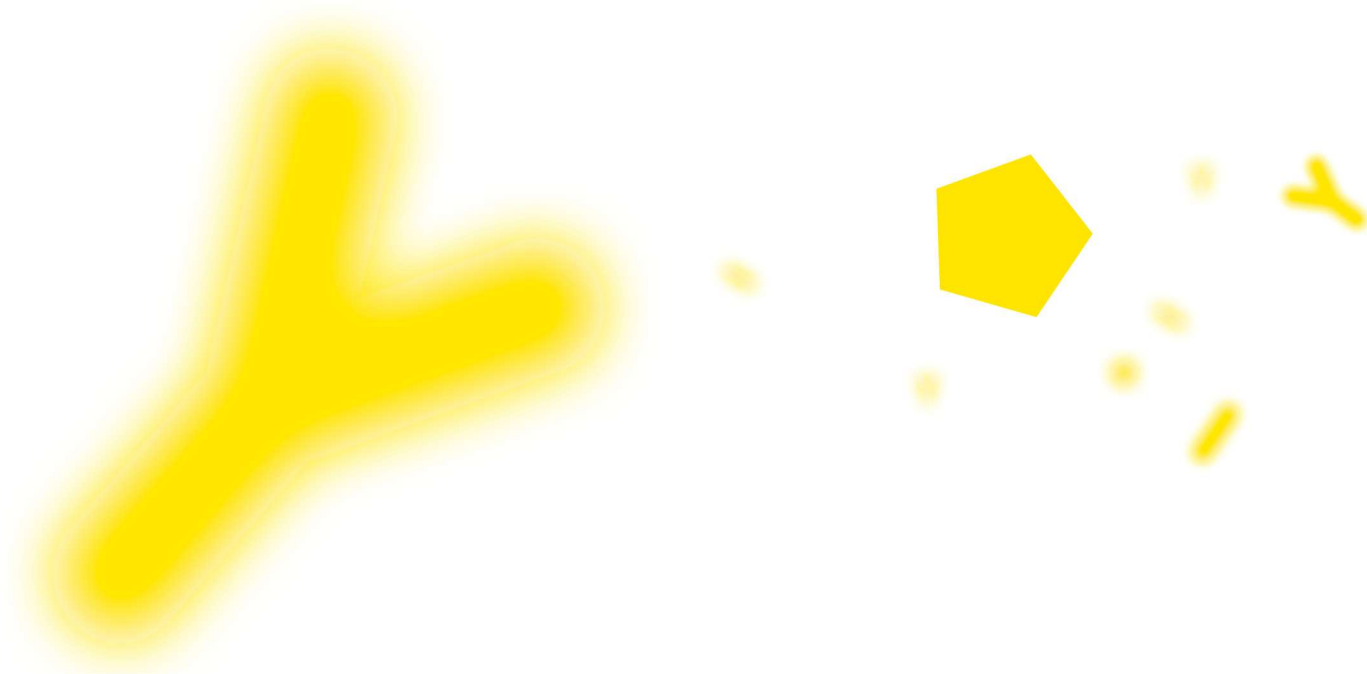
Pro více referencí k tomuto produktu navštivte naše webové stránky www.biovendor.com.

- [1] Russell Bonneville et al., Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. JCO Precis Oncol 1, 1-15(2017).
- [2] Styk, J., Pös, Z., Pös, O., Radvanszky, J., Turnova, E. H., Buglyó, G., Klimova, D., Budis, J., Repiska, V., Nagy, B., & Szemes, T. (2023). Microsatellite instability assessment is instrumental for Predictive, Preventive and Personalised Medicine: status quo and outlook. In EPMA Journal (Vol. 14, Issue 1, pp. 143–165). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13167-023-00312-w>
- [3] Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: A review of what the oncologist should know. In Cancer Cell International (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8>

VZOR

18. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

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



VZOR



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com



FOLLOW US

BIOVENDOR. GROU P