

CZE

Návod k použití:
epicGEN Solid Cancer & MSI Kit

Katalogové číslo:
RDEG0001

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.	POUŽITÍ	3
2.	SKLADOVÁNÍ, EXPIRACE	3
3.	ÚVOD	3
4.	PRINCIP STANOVENÍ	4
5.	UPOZORNĚNÍ	5
6.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	5
7.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	6
8.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	7
9.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	8
10.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	9
11.	PROTOKOL PŘÍPRAVY	10
12.	PŘÍLOHY	23
13.	VYHODNOCENÍ	25
14.	LIMITACE SOUPRAVY	25
15.	ČASTO KLADENÉ DOTAZY	26
16.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	27

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
	CZE.001.A
Nové vydání.	

1. POUŽITÍ

Souprava epicGEN Solid Cancer & MSI Kit slouží k tvorbě cílených knihoven určených k analýze pomocí sekvenace nové generace (NGS) z širokého rozpětí vstupního množství dvouřetězcové DNA (1 ng až 1 µg). Tento návod k použití popisuje pracovní postup pro analýzu vybraných regionů zájmu sloužících ke genotypizaci onkologických vzorků.

1.1 Seznam použitých zkratk

ctDNA	Cirkulující tumorová DNA
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded tkáň
gDNA	genomická DNA
MSI	Mikrosatelitní nestabilita
NGS	Sekvenování nové generace
PCR	Polymerázová řetězová reakce

2. SKLADOVÁNÍ, EXPIRACE

Jednotlivé části soupravy skladujte dle označení na štítku. Při dodržení těchto podmínek jsou všechny komponenty stabilní po dobu expirace uvedené na vnějším obalu.

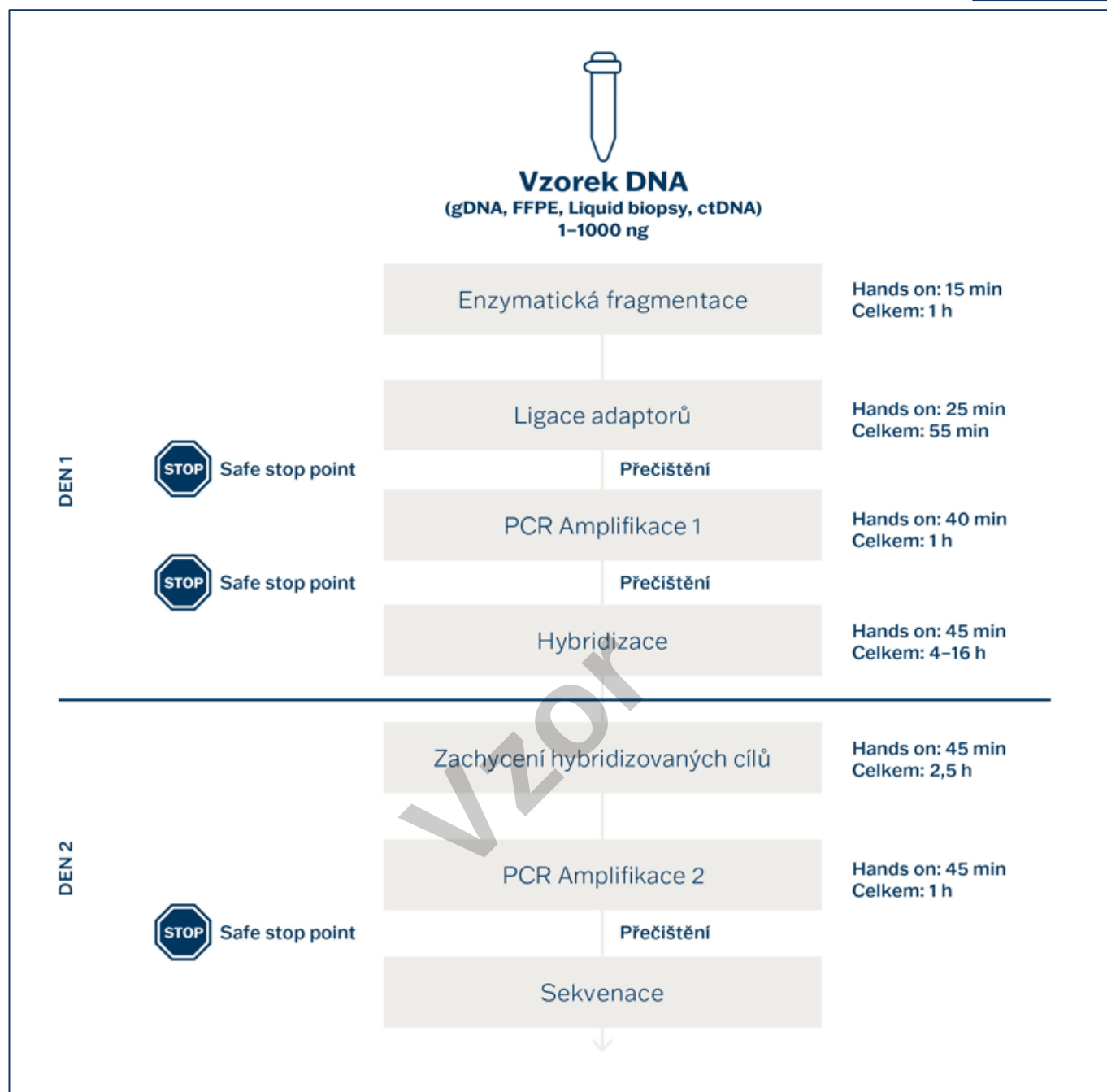
Komponenty soupravy **chráňte před světlem**.

Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

3. ÚVOD

Souprava epicGEN Solid Cancer & MSI Kit umožňuje efektivní přípravu NGS sekvenačních knihoven z dsDNA pro sekvenování na platformách Illumina®. Postup zahrnuje enzymatickou fragmentaci DNA, konstrukci NGS knihovny a následnou hybridizaci značených prób s cílovými úseky DNA (Obrázek 1).

NGS knihovny připravené tímto postupem jsou kompatibilní se sekvenátory Illumina® a GeneMind. Pro sekvenaci na jiných platformách (např. MGI, AVITI), použijte příslušný konverzní kit.



Obrázek 1: Schéma protokolu epicGEN

4. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava epicGEN Solid Cancer & MSI Kit je určena pro genotypizaci onkologicky relevantních oblastí vybraných genů (Tabulka 1) a stanovení míry mikrosatelitní nestability (MSI) (Tabulka 2). Princip vyhodnocení je stanoven na detekci variant s výskytem vyšším než 1 %.

4.1 Přehled genů obsažených v epicGEN Solid Cancer & MSI Kitu

AKT1	ALK	ARAF	ARID1A	ARID1B	ATM	ATR
BRAF	BRCA1	BRCA2	CDK12	CDKN2A	DDR2	EGFR
ERBB2	ESR1	FAT1	FGFR1	FGFR2	FGFR3	CHEK1
IDH1	IDH2	KEAP1	KRAS	MAP2K1	MET	MTOR
NF1	NRAS	NTRK1	NTRK2	NTRK3	PALB2	PIK3CA
PIK3R1	POLE	PTEN	RB1	RET	STK11	TP53

Tabulka 1: Kódující oblasti genů

BAT25	BAT26	BAT40	CAT25	D18S58	D2S123	D5S346
MONO27	NR21	NR22	NR24	NR27	TGFB2	

Tabulka 2: MSI lokusy

5. UPOZORNĚNÍ

Pouze pro profesionální použití vyškolenými pracovníky v adekvátním laboratorním prostředí.

Komponenty soupravy epicGEN Solid Cancer & MSI Kit neobsahují infekční materiál.

Se vzorky pro testování soupravou epicGEN Solid Cancer & MSI Kit je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno dodržovat standardní bezpečnostní opatření.

Nepijte, nejzte a nekuřte v prostoru, kde se pracuje s biologickým materiálem.

6. 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.

Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazujte těsně před použitím. Pracujte na ledu nebo za použití chladících stojánků.

Před použitím reagentie promíchejte jemným vortexováním a krátkou centrifugací.

Přípravu PCR a post-amplifikační kroky provádějte v oddělených laboratorních prostorech.

Zabraňte kontaminaci vzorků a reagentií. Z tohoto důvodu používejte pro každý vzorek a reagentie špičky na jedno použití.

Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

7. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Část protokolu	Balení	Reagencie	Skladování
Příprava knihoven	Box1	● epicGEN Fragmentation Buffer	-20 °C
		● epicGEN Fragmentation Enhancer	-20 °C
		● epicGEN Fragmentation Enzyme	-20 °C
		○ epicGEN Ligation Buffer	-20 °C
		○ epicGEN Ligation Enzyme	-20 °C
		○ epicGEN Adaptors	-20 °C
		● epicGEN PCR1 Master Mix	-20 °C
		○ TE Buffer	-20 °C
	Plate1	□ epicGEN UDI primers	-20 °C
Hybridizace	Box2	○ epicGEN Hybridization Buffer	-20 °C
		● epicGEN Hybridization Buffer Enhancer	-20 °C
		● Human Cot DNA	-20 °C
		○ epicGEN 2X Bead Wash Buffer	-20 °C
		○ epicGEN 10X Wash Buffer 1	-20 °C
		○ epicGEN 10X Wash Buffer 2	-20 °C
		○ epicGEN 10X Wash Buffer 3	-20 °C
		○ epicGEN 10X Stringent Wash Buffer	-20 °C
		○ NF Water	-20 °C
		○ epicGEN PCR2 Master Mix	-20 °C
		● epicGEN Primer Mix	-20 °C
		● epicGEN Blockers TS	-20 °C
		● epicGEN Solid Cancer & MSI panel	-20 °C
	Box3	● epicGEN Streptavidin Beads	4 °C

Tabulka 3 – Složení epicGEN Solid Cancer & MSI Kitu

8. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

Reagencie	Dodavatel	Katalogové číslo
Absolutní Etanol (100%)	Různí dodavatelé	Různé
Magnetické kuličky-		
-SPRIselect™ purification beads	Beckman Coulter	B23317/B23318/B2331
-Agencourt® AMPure® XP-PCR purification beads	Beckman Coulter	A63880/A63881
Digitální kapilární elektroforéza-		
-Experion™ DNA 1K Analysis Kit	Bio-Rad	700-7107
-High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626
-High Sensitivity D1000 ScreenTape®	Agilent	5067-5584
DNA kvantifikační kit-		
-Qubit™ dsDNA HS Assay Kit nebo ekvivalent	Thermo Fisher Scientific	Q32851/Q32854
-Qubit™ dsDNA BR Assay Kit nebo ekvivalent	Thermo Fisher Scientific	Q32850/Q32853
Nuclease-Free voda		
PCR zkumavky, 0,2 ml	Různí dodavatelé	Různé
96-well, low-bind PCR desky	Různí dodavatelé	Různé
Low-bind DNA Zkumavky, 1,5 ml	Různí dodavatelé	Různé
Špičky s filtrem s rozsahem 2–1000 µl	Různí dodavatelé	Různé
Microseal® B PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical	Bio-Rad	MSB1001
Digitální elektroforéza-		
-Experion Electrophoresis Station nebo ekvivalent	Bio-Rad	700-7010
-2100 Electrophoresis Bioanalyzer nebo ekvivalent	Agilent	G2939BA
-2200 TapeStation System/4200 TapeStation System nebo ekvivalent	Agilent	G2965AA/G2991AA
Qubit 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q33226
Magnetický stojánek-		
-Magnetic Separator Plate	Permagen	MSP750
-Magnetic PCR Strip Magnetic Separator Rack	Permagen	MSR812
2 PCR termocyklery	Různí dodavatelé	Různé
Mikrocentrifuga	Různí dodavatelé	Různé
Vortex	Různí dodavatelé	Různé

Tabulka 4: Materiál nedodávaný se soupravou

9. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Reagencie vždy skladujte při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kromě TE Bufferu, který lze skladovat při pokojové teplotě. Enzymy obsažené v tomto kitu jsou citlivé na teplotu. Při skladování a manipulaci je třeba dbát náležité opatrnosti. **Pro efektivnější enzymatickou aktivitu reagensů, vyjměte zkumavky s enzymy z $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před použitím je umístěte na led po dobu nejméně 10 minut.**

Po rozmrazení na ledu reagencie krátce zvortexujte (kromě epicGEN Ligation Bufferu) a před otevřením stočte v mikrocentrifuze.

Rozmrazte Ligation Buffer (pro Ligační Master Mix) při pokojové teplotě. epicGEN Ligation Buffer je viskózní a vyžaduje speciální zacházení během pipetování. Pufr pipetujte pomalu, abyste dosáhli přesného objemu.

Při tvorbě Master Mixů, upravte objemy reagensů podle potřeby, a použijte 10 % objemu navíc pro kompenzaci ztráty při pipetování. Jednotlivé reagencie přidávejte v určeném pořadí, jak je uvedeno v protokolu. Master Mixy skladujte na ledu až do jejich použití.

Magnetické kuličky (SPRISelect® nebo obdobné) používejte vždy vytemperované na pokojovou teplotu

9.1 Riziko kontaminace

Abyste snížili riziko kontaminace DNA a NGS knihovny, fyzicky oddělte laboratorní prostor a vybavení na pre-PCR a post-PCR část. Aby se zabránilo křížové kontaminaci, doporučujeme provést tyto kroky:

- Vyčistěte laboratorní prostory pomocí 0,5% chlornanu sodného (10% bělidla).
- Používejte pipetovací špičky s filtrem.
- Vždy měňte špičky pipety mezi každým vzorkem.

9.2 Size-selekce v průběhu čištění magnetickými kuličkami

Tento protokol byl optimalizován s magnetickými kuličkami SPRISelect® (Beckman Coulter), ale lze jej použít také s Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter). Při použití jiných magnetických kuliček se podmínky pro vazbu na DNA mohou lišit.

10. PŘÍPRAVA VZORKŮ

10.1 Požadavek množství a kvality DNA

Tento kit umožňuje práci se širokým rozsahem vstupního množství DNA od **1 ng – 1 µg**.

Kit umožňuje vstup DNA s různou kvalitou (vysoce kvalitní gDNA, FFPE DNA, ctDNA).

DNA před vstupem do protokolu kvantifikujte pomocí Qubit™ nebo podobnou fluorometrickou metodou.

10.2 Parametry fragmentace

Časy fragmentace uvedené v tomto protokolu platí pro vzorky FFPE kvality. Pro vzorky s vyšší kvalitou (gDNA) může být zapotřebí optimalizovat čas fragmentace.

10.3 EDTA v elučním pufru

Enzymatické reakce jsou citlivé na vysoké koncentrace EDTA, která je obvyklou součástí elučních pufrů v závěrečných krocích procesu extrakce DNA nebo purifikace. Vysoká koncentrace EDTA, (>1 mM) ve standardním TE pufru zpomalí enzymatickou fragmentaci, což má za následek větší velikosti inzertů.

Při standardních podmínkách enzymatické fragmentace (0,1 mM EDTA TE) je vyžadováno použití 1,5 µl epicGEN Fragmentation Enhanceru (zahrnuto v protokolu).

Pokud je DNA rozpuštěna ve standardním TE s 1 mM EDTA, proveďte výměnu pufru pomocí kolony nebo magnetických kuliček (pro minimální ztrátu vzorku DNA se doporučuje 3x SPRIselect®). Alternativně můžete upravit množství epicGEN Fragmentation Enhanceru použitého v kroku enzymatické fragmentace na maximálně trojnásobek, abyste dosáhli požadované délky fragmentu (až 4,5 µl epicGEN Fragmentation Enhanceru na reakci).

11. PROTOKOL PŘÍPRAVY

11.1 Enzymatická fragmentace

Poznámka: Fragmentační Master Mix a vzorky uchovávejte na ledu až do jejich umístění do termocykleru, pro ochranu proti nadměrné fragmentaci. Enzymy jsou aktivní při pokojové teplotě a mohou fragmentovat DNA na nežádoucí délku fragmentů.

1. Vzorky DNA (**1 ng – 1 µg**) přeneste do čisté PCR zkumavky a doplňte do celkového objemu **19,5 µl** pomocí **TE Bufferu**. Poté umístěte zkumavku na led.
2. Na termocykleru nastavte Fragmentační program dle Tabulka 5:

Vyhřívání víka nastavte na 70 °C		
Krok	Teplota	Čas
Chlazení	4 °C	∞
Fragmentace	32 °C	10 min
Inaktivace	65 °C	30 min
Chlazení	4 °C	< 1 hodina

Tabulka 5 - Fragmentační program

Poznámka: Nenechávejte závěrečné chlazení déle než 1 hodinu.

3. Spustěte Fragmentační program na termocykleru (bez vzorků).
4. Připravte Fragmentační Master Mix dle Tabulka 6:

Reagencie	Objem na 1 reakci
epicGEN Fragmentation Buffer	3 µl
epicGEN Fragmentation Enhancer	1,5 µl
epicGEN Fragmentation Enzyme	6 µl

Tabulka 6 - Fragmentační Master Mix

5. Fragmentační Master Mix zvortexujte, krátce stočte a do použití uložte na led.
6. Ke každému vzorku (**19,5 µl**) přidejte **10,5 µl Fragmentačního Master Mixu**, zvortexujte a krátce stočte. Výsledný objem reakce je **30 µl**.
7. Vzorky vložte do předchlazeného termocykleru a spustěte krok "Fragmentace" při 32 °C.
8. Během fragmentace připravte Ligační Master Mix.

11.2 Ligace adaptorů

Důležité: Pro vstupní množství DNA <500 ng ředte epicGEN Adaptors dle Tabulka 7. Ředění adaptorů je důležité kvůli zamezení tvorby adaptor-dimerů. **Ředění adaptorů může být upraveno pro dosažení optimálních výsledků.**

DNA vstup	Ředění adaptorů
≥500 ng	Bez ředění
100 ng	10x
10 ng	20x
1 ng	30x

Tabulka 7 - Ředění adaptorů

- Na termocykleru nastavte program **Ligace adaptorů**:

Program nastavte bez vyhřívání víka		
Krok	Teplota	Čas
Ligace	20 °C	20 min
Chlazení	4 °C	∞

Tabulka 8 - Ligace adaptorů

- Připravte **Ligační Master Mix** dle Tabulka 9:

Reagencie	Objem na 1 reakci
epicGEN Ligation Buffer	12 µl
epicGEN Ligation Enzyme	4 µl
epicGEN Adaptors	5 µl
TE Buffer	9 µl

Tabulka 9 - Ligační Master Mix

Poznámka: epicGEN Ligation Buffer je velmi viskózní, pipetujte pomalu

- Po skončení Fragmentačního programu vzorky krátce stočte a přidejte **30 µl Ligačního Master Mixu** ke každému vzorku.
- Vzorky zvortexujte a krátce stočte.
- Vzorky vložte do termocykleru a spusťte program **Ligace adaptorů**. Celkový objem reakce je **60 µl**.
- Po skončení programu, okamžitě přistupte ke kroku **Přečištění po ligaci** (krok 11.3).

11.3 Přečištění po ligaci

Poznámka: Před přečištěním nechte vytemperovat magnetické kuličky (SPRISelect®) na pokojovou teplotu (alespoň 30 minut).

1. Připravte čerstvý 80% Etanol
2. SPRISelect® zvortexujte, dokud nebudou magnetické kuličky plně homogenizovány
3. Ke každému vzorku přidejte **48 µl SPRISelect®** (0,8x ratio).
4. Vzorky lehce zvortexujte a krátce stočte (pozor, aby se kuličky neusadily na dně zkumavky).
5. Inkubujte **5 minut** při pokojové teplotě
6. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte, dokud se supernatant nevyčeří a kuličky nevytvoří ucelený pelet (cca 2 minuty).
7. Odstraňte supernatant. Pozor abyste neporušili pelet.
8. Ke vzorkům přidejte **180 µl 80% Etanolu**. Vzorky ponechte na magnetickém stojánku.
9. Inkubujte **30 sekund**, poté odstraňte supernatant.
10. Ke vzorkům přidejte **180 µl 80% Etanolu**.
11. Inkubujte **30 sekund**, poté odstraňte supernatant. Vzorky ponechte na magnetickém stojánku.
12. Odstraňte veškerý zbylý etanol 10 µl pipetou a ponechte na magnetickém stojánku do vysušení peletu (cca 2 minuty).
13. Vzorky sundejte z magnetického stojánku a přidejte **20 µl TE Bufferu**.
14. Vzorky zvortexujte do rozpuštění peletu a inkubujte **2 minuty** při pokojové teplotě.
15. Krátce stočte a umístěte vzorky na magnetický stojánek.
16. Inkubujte, dokud se supernatant nevyčeří (cca 2 minuty).
17. Se vzorky stále na magnetickém stojánku přeneste supernatant do nové zkumavky. Pozor, abyste při pipetování neporušili pelet.

Safe stop point. V tomto kroku je možné skladovat vzorky přes noc při **-20 °C**.

11.4 PCR Amplifikace 1

1. Na termocykleru nastavte program **PCR Amplifikace 1** dle Tabulka 10:

Vyhřívání víka nastavte na 105°C.			
Krok	Teplota	Čas	Cykly
Počáteční denaturace	98 °C	45 s	1
Denaturace	98 °C	15 s	4-15 (dle Tabulky 11)
Annealing	60 °C	30 s	
Extenze	72 °C	30 s	
Závěrečná extenze	72 °C	60 s	1
Chlazení	4 °C	∞	1

Tabulka 10 - Program PCR Amplifikace 1

DNA vstup	Počet cyklů
1000 ng	4
500 ng	7
100 ng	9
10 ng	12
1 ng	15

Tabulka 11 - Doporučený počet PCR cyklů

2. Ke každému vzorku přidejte **5 µl epicGEN UDI Primers**. Pro každý vzorek použijte unikátní indexový pár.
3. Přidejte **25 µl PCR1 Master Mixu**. Celkový objem reakce je **50 µl**.
4. Vzorky zvortexujte a stočte.
5. Vložte do termocykleru a spusťte program PCR1 Amplifikace.
6. Po dokončení programu okamžitě postupujte k Post-PCR přečištění.

11.5 Post-PCR přečištění

Poznámka: Před přečištěním nechte vytemperovat magnetické kuličky (SPRISelect®) na pokojovou teplotu (alespoň 30 minut).

1. Připravte čerstvý 80% Etanol
2. SPRISelect® zvortexujte, dokud nebudou magnetické kuličky plně homogenizovány
3. Ke každému vzorku přidejte **90 µl SPRISelect®** (1,8x ratio).
4. Vzorky lehce zvortexujte a krátce stočte (pozor, aby se kuličky neusadily na dně zkumavky).
5. Inkubujte **5 minut** při pokojové teplotě
6. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte, dokud se supernatant nevyčeří a kuličky nevytvoří ucelený pelet (cca 2 minuty).
7. Odstraňte supernatant. Pozor abyste neporušili pelet.
8. Ke vzorkům přidejte **180 µl 80% Etanolu**. Vzorky ponechte na magnetickém stojánku.
9. Inkubujte **30 sekund**, poté odstraňte supernatant.
10. Ke vzorkům přidejte **180 µl 80% Etanolu**.
11. Inkubujte **30 sekund**, poté odstraňte supernatant. Vzorky ponechte na magnetickém stojánku.
12. Odsajte veškerý etanol 10 µl pipetou a ponechte na magnetickém stojánku do vysušení peletu (cca 2 minuty).
13. Vzorky sundejte z magnetického stojánku a přidejte **22 µl TE Bufferu**.
14. Vzorky zvortexujte do rozpuštění peletu a inkubujte **2 minuty** při pokojové teplotě.
15. Krátce stočte a umístěte vzorky na magnetický stojánek.
16. Inkubujte, dokud se supernatant nevyčeří (cca 2 minuty).
17. Se vzorky stále na magnetickém stojánku přeneste **20 µl** supernatantu do nové zkumavky. Pozor, abyste při pipetování neporušili pelet.

Safe stop point: V tomto kroku je možné skladovat vzorky přes noc při **-20 °C**.

V tomto kroku jsou knihovny připraveny ke kvantifikaci pomocí fluorometrického měření (např. Qubit™ Fluorometer).

Doporučení: Zkontrolujte knihovny pomocí kapilární gelové elektroforézy (např. 2200 TapeStation System) pro kontrolu správné délky fragmentů. Průměrná délka by se měla pohybovat v rozmezí 250-350 bp.

11.6 Hybridizace

Pro další pokračování v protokolu doporučujeme vzorky spojit do plexů (max. 8 vzorků v plexu pro 1 hybridizační reakci). Od každého vzorku použijte **500 ng DNA**.

Důležité: Pokud připravujete knihovny z různých typů materiálu (např. gDNA, ctDNA, FFPE, atd.), spojíte do plexu vždy jen vzorky stejného typu. V opačném případě může dojít k nerovnoměrnému zastoupení vzorků v plexu a tím nedostatečné hloubce pokrytí výsledných sekvencí.

1. Na termocykleru nastavte **Hybridizační** a **Promývací program**:

Vyhřívání víka nastavte na 100 °C		
Krok	Teplota	Čas
Denaturace	95 °C	30 s
Hybridizace	65 °C	4 – 24 h

Tabulka 12 - Hybridizační program

Vyhřívání víka nastavte na 70 °C		
Krok	Teplota	Čas
Hybridizace	65 °C	∞

Tabulka 13 - Promývací program

Poznámka: Tento postup využívá zakoncentrování vzorků před hybridizací pomocí magnetických kuliček. Alternativní metodou je zakoncentrování pomocí SpeedVAC systému, postup je popsán v **Příloze 1**.

2. Připravte si **Hybridizační Master Mix** dle Tabulka 14 a uchovejte na ledu:

Reagencie	Objem na 1 reakci
epicGEN Hybridization Buffer	9,5 µl
epicGEN Hybridization Buffer Enhancer	3 µl
epicGEN Blockers TS	2 µl
epicGEN Solid cancer & MSI panel	4,5 µl
Celkem	19 µl

Tabulka 14 - Hybridizační Master Mix

Poznámka: SPRISelect® vytemperujte na pokojovou teplotu (alespoň 30 minut).

3. Spojte vzorky do plexů (max. 8 vzorků v plexu), které budou hybridizovány společně v 1 reakci. Od každého vzorku použijte objem odpovídající **500 ng DNA** (dle hodnoty na měřené pomoci Qubitu™). Pro větší objemy použijte 1,5 ml LoBind zkumavky.
4. Ke každému vzorku přidejte **7,5 µl Human Cot DNA**
5. Přidejte **1,8x** objem **SPRISelect®** (např. při objemu vzorku 100 µl přidejte 180 µl SPRISelect®).
6. Zvortexujte a inkubujte při pokojové teplotě **10 minut**.
7. Přeneste vzorky na magnetický stojánek a inkubujte **2 minuty**, nebo do vyčerení supernatantu.
8. Odstraňte supernatant. Vzorky stále držte na magnetickém stojánku.
9. Přidejte **80% Etanol**. Objem zvolte tak, aby magnetické kuličky byly zcela ponořeny pod hladinou
10. Inkubujte **30 sekund** na magnetickém stojánku
11. Odstraňte supernatant a znovu přidejte čerstvý **80% Etanol**.
12. Inkubujte **30 sekund** na magnetickém stojánku
13. Odstraňte supernatant a zbylý etanol odsajte 10 µl pipetou.
14. Nechte magnetické kuličky vyschnout (cca 2 minuty).
15. Přidejte **19 µl Hybridizačního Master Mixu** připraveného v kroku 2 kap.11.6.
16. Zvortexujte tak, aby došlo k rozpuštění peletu.
17. Inkubujte **5 minut** při pokojové teplotě.
18. Krátce stočte a vzorky umístěte na magnetický stojánek. Inkubujte do vyčerení supernatantu.
19. Do nové PCR zkumavky přeneste **17 µl** supernatantu. Supernatant odeberte opatrně, abyste nepřenesli do nové zkumavky magnetické kuličky.
20. Krátce stočte a vložte do termocykleru.
21. Spustěte **Hybridizační program**. Hybridizaci nechte puštěnou minimálně **4 hodiny**. Se vzorky bude dále pokračováno v kroku 2 kap. 11.9.

Poznámka: Pro optimální efektivitu hybridizace nechte program běžet přes noc. Ne však déle než 24 hodin.

11.7 Příprava hybridizačních pufrů

Poznámka: Pro zachycení a promytí hybridizovaných cílů je zapotřebí minimálně 4 pozice v termocykleru na každý vzorek. Při větším počtu než 24 vzorků, je nutno použít 2 termocyklery.

1. Připravte **1X Promývací pufr** dle Tabulka 15:

Zásobní reagentie	Objem na 1 reakci (10% rezerva započítána)		
	Pufr	NF Voda	Celkem
epicGEN 2X Bead Wash Buffer	165 µl	165 µl	330 µl
epicGEN 10X Wash Buffer 1	27,5 µl	247,5 µl	275 µl
epicGEN 10X Wash Buffer 2	16,5 µl	148,5 µl	165 µl
epicGEN 10X Wash Buffer 3	16,5 µl	148,5 µl	165 µl
epicGEN 10X Stringent Wash Buffer	33 µl	297 µl	330 µl

Tabulka 15 - Příprava 1X Promývacích pufrů

Poznámka: Pokud se v epicGEN 10X Wash Bufferu 1 tvoří sraženiny nebo je mléčně zakalený, zahřejte zásobní roztok na 65 °C a zvortexujte, dokud se roztok nevyčereí.

1X Pracovní roztoky pufrů lze uchovat při pokojové teplotě až 4 týdny.

2. Pro každou hybridizační reakci si připravte následující reagentie, které budou během procesu umístěny v termocykleru (3 pozice v termocykleru pro 1 vzorek):

Reagentie	Objem
1X Wash Buffer 1	110 µl
1X Stringent Wash Buffer	160 µl
1X Stringent Wash Buffer	160 µl

Tabulka 16 – Objem reagentií pro promývání v termocykleru

Tip: Pro každou z reagentií použijte nový PCR strip, který po použití odstraníte.

Poznámka: Zbytek 1X Wash Bufferu 1 nevyhazujte, bude použit v kroku Promývání při pokojové teplotě.

3. Připravte **Rozpouštěcí Master Mix** dle Tabulka 17:

Reagentie	Objem na 1 reakci
epicGEN Hybridization Buffer	8,5 µl
epicGEN Hybridization Buffer Enhancer	2,7 µl
NF Water	5,8 µl

Tabulka 17 – Rozpouštěcí Master Mix

Poznámka: Rozpouštěcí Master Mix ponechte na ledě až do jeho použití.

11.8 Příprava Streptavidinových kuliček

1. Vytemperujte **epicGEN Streptavidin Beads** na pokojovou teplotu (alespoň 30 minut) a pořádně zvortexujte.
2. Do PCR zkumavky napipetujte **50 µl epicGEN Streptavidin Beads** pro každou hybridizační reakci
3. Přidejte **100 µl 1X Bead Wash Bufferu** (z kroku 1. kap. 11.7) a propipetujte 10x pro úplnou homogenizaci roztoku.
4. Přeneste vzorky na magnetický stojánek a inkubujte, dokud se supernatant nevyčechá.
5. Odstraňte supernatant, aniž byste porušili pelet
6. Opakujte kroky 3.-5. ještě 2x pro celkový počet 3 promytí.
7. Ke kuličkám přidejte **17 µl Rozpouštěcího Master Mixu** z kroku 3, kap. 11.7.
8. Zvortexujte pro úplnou homogenizaci roztoku a krátce stočte.
9. Resuspendované **epicGEN Streptavidin Beads** ponechte při pokojové teplotě do kroku 4 kap. 11.9.

11.9 Zachycení hybridizovaných cílů

1. Zapněte na termocykleru **Promývací program** (krok 1, kap. 11.6). Při dosažení teploty 65 °C vložte do termocykleru připravené 1X Promývací pufrы z kroku 2, kap. 11.7.
2. Po skončení **Hybridizačního programu** (krok 1, kap. 11.6), vyjměte vzorky z termocykleru a krátce stočte.
3. Na termocykleru okamžitě spusťte **Promývací program**.

Poznámka: V tuto chvíli běží 2 termocyklery na stejný **Promývací program**. V jednom termocykleru se zahřívají 1X Promývací pufrы, ve druhém se budou inkubovat vzorky. V případě menšího počtu vzorků (<24) lze inkubovat vzorky i Promývací pufrы v jenom termocykleru.

4. Ke vzorkům přidejte **epicGEN Streptavidin Beads** z kroku 9, kap. 11.8.
5. Zvortexujte a krátce stočte.
6. Vzorky vložte do termocykleru s aktivním Promývacím programem
7. Inkubujte **45 minut**. Každých 10–12 minut vzorky vyjměte a lehce zvortexujte, aby nedocházelo k usazování kuliček na dně zkumavky.

11.10 Promývání v termocykleru

Poznámka: Během celého procesu Promývání v termocykleru, udržujte 1X Promývací roztoky při 65 °C.

1. Po skončení 45minutové inkubace, vyjměte vzorky z termocykleru a stočte.
2. Ke každému vzorku přidejte **100 µl** předehřátého **1X Wash Bufferu** a 10x propipetujte. Vyvarujte se tvorbě bublin ve zkumavce. Zavřete víko termocykleru s promývacími pufrý a nechte spuštěný **Promývací program**.
3. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte do vyčerení supernatantu.
4. Odstraňte supernatant a sundejte vzorky z magnetického stojánku.
5. Přidejte **150 µl** předehřátého **1X Stringent Bufferu** a 10x propipetujte. Vyvarujte se tvorbě bublin ve zkumavce.
6. Vzorky inkubujte **5 minut** v termocykleru s aktivním **Promývacím programem**.
7. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte do vyčerení supernatantu.
8. Odstraňte supernatant a sundejte vzorky z magnetického stojánku.
9. Přidejte **150 µl** předehřátého **1X Stringent Bufferu** a 10x propipetujte. Vyvarujte se tvorbě bublin ve zkumavce.
10. Vzorky inkubujte **5 minut** v termocykleru s aktivním **Promývacím programem**.
11. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte do vyčerení supernatantu.

Poznámka: v tomto kroku můžete vypnout Promývací program na termocyklerech.

11.11 Promývání při pokojové teplotě

1. Odstraňte supernatant a přidejte **150 µl 1X Wash Bufferu 1**.
2. Zvortexujte do úplné homogenizace kuliček.
3. Inkubujte **2 minuty** při pokojové teplotě. Po skončení inkubace krátce stočte.
4. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte do vyčerení supernatantu.
5. Odstraňte supernatant, sundejte vzorky z magnetického stojánku a přidejte **150 µl 1X Wash Bufferu 2**. Vzorky zvortexujte do úplné homogenizace kuliček.
6. Inkubujte **2 minuty** při pokojové teplotě. Po skončení inkubace krátce stočte.
7. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte do vyčerení supernatantu.
8. Odstraňte supernatant, sundejte vzorky z magnetického stojánku a přidejte **150 µl 1X Wash Bufferu 3**. Vzorky zvortexujte do úplné homogenizace kuliček.
9. Inkubujte **2 minuty** při pokojové teplotě. Po skončení inkubace krátce stočte.
10. Umístěte na magnetický stojánek a inkubujte do vyčerení supernatantu.

11. Odstraňte supernatant. Použijte 10 µl pipetu pro odstranění veškeré zbývající tekutiny (v případě potřeby krátce stočte, umístěte zpět na magnet a odsajte zbytky tekutiny).
12. Přidejte **20 µl NF Water** a zvortexujte do úplné homogenizace kuliček. Krátce stočte.

Poznámka: Magnetické kuličky ponechejte ve vzorku až do dalšího kroku. Nevyhazujte je.

11.12 PCR Amplifikace 2

1. Připravte si **Amplifikační Master Mix 2** dle Tabulka 18:

Reagencie	Objem na 1 reakci
epicGEN PCR2 Master Mix	25 µl
epicGEN Primer Mix	1,25 µl
NF Water	3,75 µl

Tabulka 18 – Amplifikační Master Mix 2

2. Na termocykleru nastavte program **PCR Amplifikace 2** dle Tabulka 19:

Vyhřívání víka nastavte na 105°C.			
Krok	Teplota	Čas	Cyklů
Počáteční denaturace	98 °C	45 s	1
Denaturace	98 °C	15 s	14
Annealing	60 °C	30 s	
Extenze	72 °C	30 s	
Závěrečná extenze	72 °C	1 min	1
Chlazení	4 °C	∞	-

Tabulka 19 – Program PCR Amplifikace 2

Poznámka: Počet PCR cyklů může být optimalizován. V případě menšího počtu vzorků v plexu než 8, přidejte cykly (4-plex: +1 cyklus; 1-plex: +2 cykly).

3. Ke každému vzorku přidejte **30 µl Amplifikačního Master Mixu**, zvortexujte a krátce stočte. Celkový objem reakce je **50 µl**.
4. Vložte vzorky do termocykleru a spusťte **PCR Program 2**.

11.13 Přečištění

Poznámka: Vytemperujte SPRISelect® na pokojovou teplotu (alespoň 30 minut).

1. Připravte si čerstvý 80% Etanol. Pro každý vzorek budete potřebovat min. 250 µl.
2. Ke každému vzorku přidejte **75 µl SPRISelect®** (1,5x ratio).
3. Vzorky lehce zvortexujte a krátce stočte (pozor, aby se kuličky neusadily na dně zkumavky).
4. Inkubujte **5 minut** při pokojové teplotě
5. Umístěte vzorky na magnetický stojánek a inkubujte, dokud se supernatant nevyčeří (cca 2 minuty).
6. Odstraňte supernatant. Pozor abyste neporušili pelet.
7. Ke vzorkům přidejte **125 µl 80% Etanolu**.
8. Inkubujte **1 minutu** na magnetickém stojánku.
9. Odstraňte supernatant a přidejte **125 µl 80% Etanolu**.
10. Inkubujte **1 minutu** na magnetickém stojánku.
11. Odstraňte supernatant a 10 µl pipetou odsajte veškerý zbylý etanol a ponechte na magnetickém stojánku do vysušení peletu.
12. Vzorky suňte z magnetického stojánku a přidejte **22 µl TE Bufferu**.
13. Vzorky zvortexujte do rozpuštění peletu a inkubujte **5 minut** při pokojové teplotě.
14. Krátce stočte a umístěte vzorky na magnetický stojánek.
15. Inkubujte dokud se supernatant nevyčeří (cca 2 minuty).
16. Přeneste **20 µl** supernatantu do nové PCR zkumavky.

11.14 Kontrola kvality knihoven

1. Změřte koncentraci knihoven pomocí Qubit™ dsDNA HS Assay kitu, nebo podobné, fluorometricky založené kvantifikační metodě. Koncentrace správně připravené knihovny se pohybuje od 2 ng/µl výše.
2. Zkontrolujte správnou délku fragmentů knihovny pomocí digitální gelové elektroforézy (např. Agilent 2200 TapeStation®, nebo podobné). Průměrná délka fragmentů se pohybuje v rozmezí 250–350 bp.

11.15 Sekvenace

Ředění a denaturaci knihoven epicGEN provedte dle manuálu příslušného Illumina sekvenátoru. Doporučená hloubka čtení je 4 miliony paired-end readů (2 miliony klastrů) na vzorek, doporučená konfigurace sekvenačního runu dle Tabulka 20:

Čtení	Cyklů
Read1	151
Index1	8
Index2	8
Read2	151

Tabulka 20 - Konfigurace sekvenačního runu

Knihovny epicGEN jsou kompatibilní se všemi sekvenátory Illumina® a GeneMind. Pro sekvenaci na přístrojích AVITI a MGI použijte příslušný protokol pro konverzi sekvenačních adaptorů.

Vzor

12. PŘÍLOHY

12.1 Příloha 1 – Zakoncentrování vzorků před hybridizací pomocí SpeedVAC systému

1. Spojte vzorky do plexů (max. 8 vzorků v plexu), které budou hybridizovány společně v 1 reakci. Od každého vzorku použijte objem odpovídající 500 ng DNA (dle hodnoty na měřené na Qubitu). Pro větší objemy použijte 1,5 ml LoBind zkumavky.

Připravte **Blocker Mix** pro každou reakci dle Tabulka 21:

Reagencie	Objem na 1 reakci
Human Cot DNA	5 µl
epicGEN Blockers TS	2 µl

Tabulka 21 - Blocker Mix

2. Přidejte **7 µl Blocker Mixu** ke každému vzorku.
3. Vložte vzorky do SpeedVAC systému a nechte zcela vysušit.

Safe Stop Point: Vysušené vzorky lze dlouhodobě skladovat při -20°C .

4. Připravte **Hybridizační Master Mix** dle Tabulka 22:

Reagencie	Objem na 1 reakci
epicGEN Hybridization Buffer	8,5 µl
epicGEN Hybridization Buffer Enhancer	2,7 µl
epicGEN Solid cancer & MSI panel	4 µl
NF Water	2 µl
Celkem	17 µl

Tabulka 22 – Hybridizační Master Mix

5. **Hybridizační Master Mix** zvortexujte a stočte.
6. Ke každému vysušenému vzorku přidejte **17 µl Hybridizačního Master Mixu**.
7. Zvortexujte do úplného rozpuštění DNA a krátce stočte.
8. Inkubujte **5 minut** při pokojové teplotě.
9. Krátce zvortexujte a stočte. Pokud jste pracovali v 1,5 ml LoBind zkumavkách, přeneste vzorky do PCR stripu.
10. Vložte vzorky do termocykleru a spusťte **Hybridizační program** (krok 1, kap.11.6). Hybridizaci nechte puštěnou minimálně **4 hodiny**. Se vzorky bude dále pokračováno v kroku 2 kap. 11.9.

Poznámka: Pro optimální efektivitu hybridizace nechte program běžet přes noc. Ne však déle než 24 hodin.

V protokolu pokračujte krokem **11.7. Příprava hybridizačních pufrů.**

12.2 Příloha 2 – Sekvence indexů

Pozice v desce	i7 index	i5 index Forward ¹	i5 index Reverse Complement ²
A1	CTGATCGT	ATATGCGC	GCGCATAT
B1	ACTCTCGA	TGGTACAG	CTGTACCA
C1	TGAGCTAG	AACCGTTC	GAACGGTT
D1	GAGACGAT	TAACCGGT	ACCGGTTA
E1	CTTGTCGA	GAACATCG	CGATGTTC
F1	TTCCAAGG	CCTTGTAG	CTACAAGG
G1	CGCATGAT	TCAGGCTT	AAGCCTGA
H1	ACGGAACA	GTTCTCGT	ACGAGAAC
A2	CGGCTAAT	AGAACGAG	CTCGTTCT
B2	ATCGATCG	TGCTTCCA	TGGAAGCA
C2	GCAAGATC	CTTCGACT	AGTCGAAG
D2	GCTATCCT	CACCTGTT	AACAGGTG
E2	TACGCTAC	ATCACACG	CGTGTGAT
F2	TGGACTCT	CCGTAAGA	TCTTACGG
G2	AGAGTAGC	TACGCCTT	AAGGCGTA
H2	ATCCAGAG	CGACGTTA	TAACGTCG

¹ sekvence pro MiSeq, MiniSeq Rapid Reagent kit, NovaSeq v1.0 Reagent kit

² sekvence pro iSeq 100, NextSeq, MiniSeq Standard reagent kit, NovaSeq v1.5 Reagent kit

Tabulka 23 - Sekvence indexů

13. VYHODNOCENÍ

Pro vyhodnocení sekvenačních dat použijte software GENOVESA, který je dostupný online na adrese ngs-genovesa.biovendor.group.

GENOVESA modul Genomics

Jedná se o cloudové all-in-one řešení pro analýzu hrubých dat sekvenátorů (FASTQ files) s technickou a aplikační podporou.

Software umožňuje:

- pokročilou kontrolu kvality sekvenačních dat
- automatické upozornění na regiony s nízkým pokrytím
- jednoduchou filtraci relevantních variant
- možnost customizace
- ukládat patientská data a varianty do interní databáze
- report na jedno kliknutí

14. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava epicGEN Solid Cancer & 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 epicGEN Solid Cancer & MSI Kit je navržena pro genotypizaci vzorků DNA pomocí technologie NGS
- Negativní výsledek nevylučuje mutace pod limitem detekce metody.

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

15. ČASTO KLADENÉ DOTAZY

1. Kolik vzorků minimálně musím připravovat najednou?

Kit je optimalizován pro práci s 8-násobky vzorků. V kitu je dostatek reagensů pro 2 hybridizační reakce optimalizované pro 8 vzorků.

2. Lze hybridizovat i jiný počet vzorků, než 8 v jedné reakci?

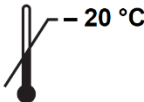
Ano, je to možné. Pokud budete připravovat menší počet vzorků, nehrozí riziko snížení výkonu kitu (ale dříve spotřebujete hybridizační chemii). Pokud budete připravovat více než 8 vzorků v jedné hybridizační reakci, nemusí být výsledné pokrytí všech cílů rovnoměrné a některé nemusí dosáhnout požadovaného pokrytí vůbec.

3. Je kit určen pro vzorky s nižší kvalitou DNA? (např. FFPE, ctDNA, ...)

Ano, protokol je přizpůsoben práci jak se vzorky horší kvality, tak vysoce kvalitní gDNA.

Vzor

16. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použit 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