

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit

Katalogové číslo:
RDNGS0020-32

Pouze pro výzkumné účely



**BioVendor
R&D®**



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com

1.	URČENÝ ÚČEL	3
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)	11
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	12
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	13
12.	POSTUP STANOVENÍ	14
13.	VYHODNOCENÍ	21
14.	LIMITACE SOUPRAVY	23
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	24
16.	ČASTO KLADENÉ DOTAZY	26
17.	REFERENCE	27
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	28

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.001.A	CZE.002.A
Kap. 8: Úprava Tabulky 2.	

1. URČENÝ ÚČEL

RDNGS0020-32 fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci **vybraných oblastí genů EGFR a HER2 (ERBB2)** sekvenováním nové generace (NGS). Přesná specifikace vybraných oblastí zájmu je uvedena v Tabulka 1.

Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.

Označení oblasti	Specifikace oblasti	Pozice oblasti dle GRCh38/hg38		
		Chromozom	Start	Stop
EGFR exon 18	část exonu	chr7	55173944	55174028
EGFR exon 19	část exonu	chr7	55174767	55174819
EGFR exon 20	část exonu	chr7	55181292	55181407
EGFR exon 21	část exonu	chr7	55191814	55191845
HER2 (ERBB2) exon 7	část exonu	chr17	39710330	39710441
HER2 (ERBB2) exon 8	část exonu	chr17	39711924	39712014
HER2 (ERBB2) exon 17	část exonu	chr17	39723348	39723442
HER2 (ERBB2) exon 19	část exonu	chr17	39723892	39724005
HER2 (ERBB2) exon 20	část exonu	chr17	39724718	39724822
HER2 (ERBB2) exon 21	část exonu	chr17	39725063	39725161

Tabulka 1: Specifikace vybraných oblastí zájmu soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit

1.1 Použité zkratky

Ct	číslo cyklu (Cycle Threshold)
ctDNA	cirkulující nádorová DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
<i>EGFR</i>	receptor pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/ Asymmetrical Cyanine Dye
FFPE	vzorky fixované formalinem a zalité v parafinu (formalin-fixed, paraffin-embedded)
<i>HER2</i>	receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
LoD	limit detekce (Limit of Detection)
NC	negativní kontrola (Negative Control)
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PC	pozitivní kontrola (Positive Control)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

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 genů *EGFR* a *HER2*.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů.
- Souprava fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit je určena pro vyšetření mutací v genech *EGFR* a *HER2* u 32 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit vyžaduje **pouze přidání izolované DNA** ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru.

3. SKLADOVÁNÍ

Soupravu skladujte při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za těchto podmínek jsou všechny komponenty stabilní po dobu expirace uvedené na vnějším obalu.

- Souprava fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

Gen *EGFR* kóduje receptor epidermálního růstového faktoru, což je transmembránová tyrosinkináza podílející se na regulaci buněčné proliferace a přežití. Aktivační mutace, zejména delece v exonu 19 a bodová mutace L858R v exonu 21, jsou časté u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) a předpovídají citlivost na inhibitory tyrosinkinázy EGFR (TKI). Méně časté mutace, jako jsou G719X, L861Q a inserce v exonu 20 (Ex20ins), vykazují proměnlivou citlivost na TKI, což často vede k horším klinickým výsledkům. Mutace Ex20ins jsou obzvláště spojovány s rezistencí na konvenční TKI, což vyžaduje alternativní terapeutické strategie. Nově vyvíjené léčby zaměřené na tyto mutace jsou aktuálně předmětem výzkumu s cílem zlepšit prognózu pacientů [1, 2].

Gen *HER2* (*ERBB2*) kóduje receptor tyrosinkinázy, který po alteraci přispívá k onkogenezi v různých typech nádorů, včetně NSCLC. Alterace *HER2* u NSCLC zahrnují genové amplifikace, nadměrnou expresi a bodové mutace, zejména inserce v exonu 20. Tyto mutace se podílejí na nádorovém růstu a byly identifikovány jako potenciální cíle pro terapeutickou intervenci. Nedávné studie prokázaly účinnost léčby cílené na *HER2*, jako je trastuzumab, deruxtecan, u pacientů s *HER2*-mutovaným NSCLC, čímž otevírají nové možnosti léčby [3, 4].

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

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

- cílovou sekvenci pro účely genotypizace (úsek DNA)
- adaptérovou sekvenci pro nasedání sekvenačních primerů
- indexovou sekvenci, která je pro vzorek v daném běhu unikátní, sloužící ke ztotožnění získaných výsledků s odpovídajícím vzorkem DNA (pacientem) a umožňuje tak paralelní sekvenování více vzorků v jednom běhu
- sekvenci pro navázání DNA konstruktů na povrch flowcellly

5. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit slouží k přípravě sekvenační knihovny za účelem vyšetření mutačního statusu vybraných oblastí genů *EGFR* a *HER2* 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 281 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 EGFR/HER2 Cancer 32-kit vyžaduje pouze přidání izolované DNA ke konkrétnímu Master Mixu a amplifikaci pomocí Real-Time PCR termocykleru.

K vyhodnocení sekvenačních dat je doporučen software GENOVESA, modul fastGEN, který je součástí komplexního řešení.

6. UPOZORNĚNÍ

- **Pouze pro profesionální použití vyškolenými pracovníky v adekvátním laboratorním prostředí.**
- Komponenty soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno dodržovat standardní bezpečnostní opatření.
- Nepijte, nejezte a nekuřte v prostoru, kde se pracuje s biologickým materiálem.

7. TECHNICKÁ DOPORUČENÍ

- Před a po každém testu musí být pracovní prostředí dekontaminováno vhodnými prostředky odstraňujícími RNázy, DNázy i standardními dezinfekčními prostředky. Práce v nevhodném prostředí může vést ke kontaminaci komponent souprav.
- Master Mixy nealikvotujte ani opakovaně nerozmrazujte, vícenásobné rozmražení může negativně ovlivnit kvalitu testu.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazujte těsně před použitím. Minimalizujte dobu, kdy jsou reagenty při běžné laboratorní teplotě. Pracujte na ledu nebo za použití chladících stojánků.
- Před použitím reagenty promíchejte jemným vortexováním a krátce zcentrifugujte.
- Přípravu qPCR a post-amplifikační kroky provádějte v oddělených laboratorních prostorech.
- Zabraňte kontaminaci vzorků a reagentů. Z tohoto důvodu používejte pro každý vzorek a reagent špičky na jedno použití.
- Nekombinujte reagenty ze souprav různých výrobních šarží.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

8. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 32 vzorků, tj. k provedení 32 reakcí (Tabulka 2). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce pro geny *EGFR* a *HER2*.

Složení soupravy	Sekvence indexů P7	Sekvence indexů P5	Objem v 1 zkušavce (μl)	Počet zkušavek	Forma dodání
EGFR/HER2 Master Mix A07	CTACTGGT	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A08	AATACGGT	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A09	CCGGAAGT	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A11	AGCGATCT	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A12	GTACCTTG	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A13	ATGGTTGG	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A15	GAGCTACG	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix A16	GACTGCAG	TCGTCGGC	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B07	CTACTGGT	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B08	AATACGGT	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B09	CCGGAAGT	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B11	AGCGATCT	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B12	GTACCTTG	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B13	ATGGTTGG	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix B15	GAGCTACG	CTCAGACG	18	1	přímé použití

Složení soupravy	Sekvence indexů P7	Sekvence indexů P5	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
EGFR/HER2 Master Mix B16	GACTGCAG	CTCAGACG	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C07	CTACTGGT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C08	AATACGGT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C09	CCGGAAGT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C11	AGCGATCT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C12	GTACCTTG	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C13	ATGGTTGG	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C15	GAGCTACG	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix C16	GACTGCAG	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D07	CTACTGGT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D08	AATACGGT	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D09	CCGGAAGT	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D11	AGCGATCT	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D12	GTACCTTG	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D13	ATGGTTGG	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D15	GAGCTACG	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
EGFR/HER2 Master Mix D16	GACTGCAG	TCTGAGTA	18	1	přímé použití

Tabulka 2: Složení soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů *EGFR* a *HER2* (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.

10.1 fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit: Master Mix

Pro genotypizaci genů *EGFR* a *HER2* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek EGFR/HER2 Master Mix a uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

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 3.
- 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 EGFR/HER2 Master Mixy).
- Do jedné reakce pipetujte vždy **5 µl DNA** vzorku připraveného dle Tabulka 3.
- 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 3: Stanovení vhodného ředění DNA do PCR reakce

Doporučení:

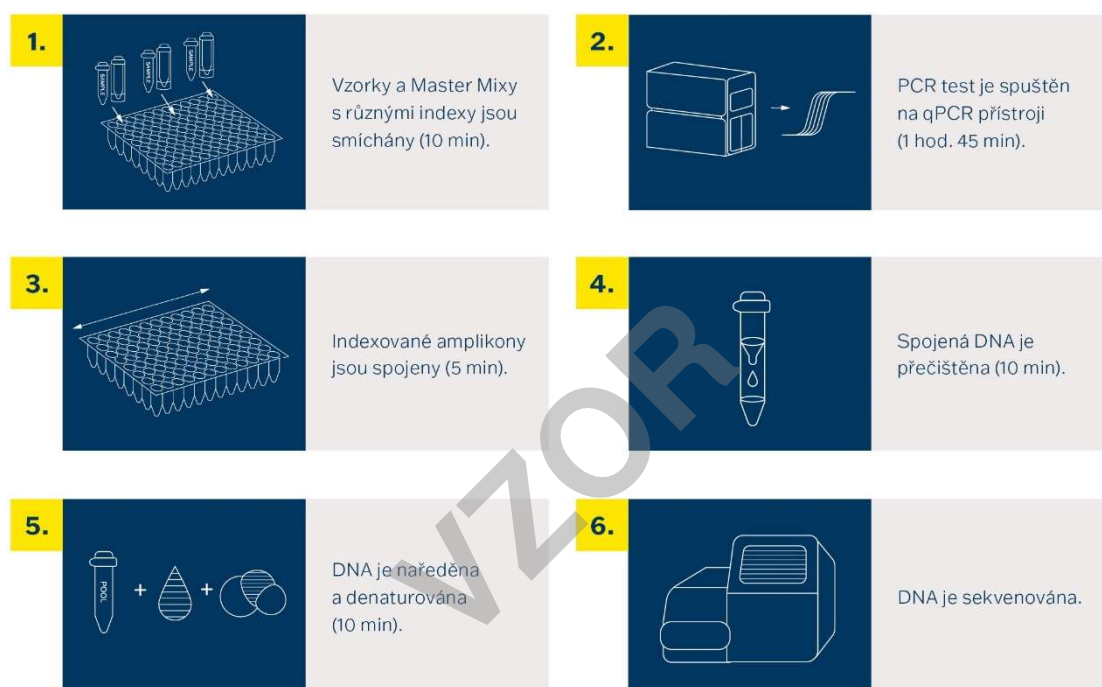
Do každého běhu testování pomocí fastGEN EGFR/HER2 32-kit je doporučeno přidávat **pozitivní kontrolu (PC)**; standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu, není dodáván se soupravou) a **negativní kontrolu (NC)** pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. Při nedodržení tohoto doporučení nelze vyloučit falešně pozitivní či negativní výsledky. PC připravte obdobným ředěním jako vyšetřované vzorky DNA.

S pozitivní kontrolou manipulujte s opatrností a pipetujte jako poslední součást reakce. Při nevhodné manipulaci může dojít ke kontaminaci testu a falešně pozitivním výsledkům. Při podezření na kontaminaci test opakujte.

12. POSTUP STANOVENÍ

Technologie NGS umožňuje sekvenovat všechny požadované úseky DNA se sekvenačním pokrytím v řádu tisíců čtení pro každý vzorek. Metoda je proto vysoce citlivá a dokáže odhalit somatickou mutaci ve frekvenci od 2 % při minimální vstupu 1 ng DNA.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 32 vzorků pro genotypizaci vybraných oblastí genů *EGFR* a *HER2* 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 pro Master Mix 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 Mix daného indexu (viz kapitola 11).
 - Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu pro Master Mix 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 jamky **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 32.
- Jednotlivé Master Mixy otvírejte postupně a vždy těsně před přidáním do reakce, poté ihned uzavřete. Zabraňte současnému otevírání více Master Mixů, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci.
- Zalepte PCR desku lepicí fólií nebo uzavřete mikrozskumavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280 x g).

12.1.3 qPCR

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

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

Krok	Čas	Teplota	
denaturace	2 min	95 °C	
amplifikační cyklus	15 s	95 °C	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 4: Program qPCR amplifikace († volitelný krok)

- Zadejte identifikaci vzorků do ovládacího programu Real-Time PCR termocykleru.
- Spusťte 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 genotypizaci genů *EGFR/HER2*:
 - Smíchejte jednotlivé amplikony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 8 vzorků smíchejte jednotlivé amplikony v množství 3 µl PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 24 µl.
 - Finální objem DNA poolu stanovte dle používaného kitu pro purifikaci DNA poolu.
 - Doporučení: V případě, že vzorek vykazuje hodnotu $Ct > 31$ přidejte dvojnásobek, ev. pro $Ct > 34$ trojnásobek objemu ampliconu do DNA poolu. V případě, že vzorek vykazuje hodnotu $Ct > 36$, do DNA poolu ho nepřidávejte a vyřaďte 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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 281)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- **281 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 knihovny

Sekvenační knihovna připravená pomocí fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina® a využívá Illumina® sekvenační primery.

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 nařed'ěného 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 **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 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.

Pipetujte 600 µl naředěné 10pM DNA knihovny do sekvenační kazety do pozice 17.

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 200 mM 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.

Pipetujte 500 µl naředěné 1,4pM nebo 1,6pM DNA knihovny do pozice 16.

12.3.7 Doporučení pro sekvenátor NextSeq 500/550

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 3,6–4,4 nM. Přidejte fastGEN DNA pool k zředěnému poolu další sekvenační knihovny. Denaturujte 5 µl celkového DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveného 0,2M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Přidejte 5 µl 200mM Tris-HCl. Zřed'te denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 20 pM. Následně nařed'te 20pM DNA pool vychlazeným HT1 na finální koncentraci 1,5 pM (např. 100 µl 20pM DNA pool + 1 233 µl HT1) pro Mid Output nebo 1,8 pM (např. 120 µl 20pM DNA pool + 1 213 µl HT1) pro High Output. Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Pipetujte 1 300 µl naředěné 1,5pM nebo 1,8pM DNA knihovny do pozice 10.

12.3.8 Doporučení pro sekvenátor NovaSeq, reagent kit v1.5 SP, S1, S2, S4

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 1–2 nM. Přidejte fastGEN DNA pool ke zředěnému poolu další sekvenační knihovny. Typicky fastGEN knihovna vyžaduje 0,2–1 % sekvenační kapacity kitu NovaSEQ SP. Ředění a podíl je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty a počtu čtení na vzorek. Denaturujte celkový DNA pool (SP/S1 100 µl; S2 150 µl; S4 310 µl) pomocí čerstvě připraveného 0,2M NaOH (SP/S1 25 µl; S2 37 µl; S4 77 µl) po dobu 8 min při pokojové teplotě. Přidejte 400mM Tris-HCl (SP/S1 25 µl; S2 38 µl; S4 78 µl).

Pipetujte 150 µl (SP, S1), 225 µl (S2), 465 µl (S4) naředěné, denaturované a neutralizované knihovny do pozice 8.

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 *EGFR/HER2*

Výsledek genotypizace genů ***EGFR/HER2*** je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byly detekovány varianty genů *EGFR* a *HER2* s frekvencí $\geq 2\%$ při vstupu minimálně 1 ng DNA

V případě pozitivního nálezu mutace v genu *EGFR/HER2* v rozsahu frekvence 1–2 % doporučujeme vyšetření zopakovat nebo verifikovat jinou metodou.

Výsledek genotypizace pro **vzorky s velmi nízkou koncentrací DNA** je považován za validní, pokud se výsledek detekce varianty genu shoduje pro oba replikáty s odlišnými Master Mixy.

13.2 Negativní výsledek

Pokud nejsou dané varianty detekovány, nebo nedosahuje jejich četnost předepsané frekvence, výsledek genotypizace je negativní (bez mutace).

13.3 Interpretace PC a NC

Zahrnutí pozitivní a negativní kontroly pro každý běh testu (skupinu vzorků měřenou současně) je doporučeno pro kontrolu správného provedení přípravy DNA knihovny a vyloučení technických problémů.

13.3.1 Pozitivní kontrola musí splňovat následující kritéria:

- V qPCR amplifikačním kroku přípravy knihovny je detekována s hodnotou minimálně o 3 Ct nižší než NC ($Ct_{PC} + 3 \leq Ct_{NC}$).
- Po vyhodnocení sekvenačních dat vykazuje přítomnost daných variant genů *EGFR* a *HER2* 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, zařaďte vzorek NC 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 EGFR/HER2 Cancer 32-kit je validována na DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích, na cirkulující nádorové DNA (ctDNA), na syntetických DNA kontrolách a referenčních standardech.
- Výsledek testu je ovlivněn kvalitou vzorku. Správný postup odběru, transportu, izolace DNA a skladování vzorků je pro vyšetření důležitý. Kvalita vzorku (integrita DNA) ovlivňuje jeho amplifikovatelnost. Za kvalitu vzorků zodpovídá uživatel soupravy.
- Výsledky genotypizace by měly být hodnoceny odborným pracovníkem ve zdravotnictví.
- Souprava fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenční knihovny, potřebné pro genotypizaci vybraných oblastí genů *EGFR* a *HER2* technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů nebo jiných než vybraných oblastí genů *EGFR* a *HER2* uvedených v Tabulka 1, nejsou kitem fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit detekovatelné.
- 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.
- Výrobce deklaruje pozitivní nález mutací pouze v rozsahu stanoveném v analytické charakteristice soupravy (Tabulka 5). Stanovení dalších mutací nacházejících se ve vybraných oblastech genů *EGFR* a *HER2* (viz Tabulka 1) je pomocí soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit možné, není však výrobcem deklarováno.
- Za validaci soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit v kombinaci s dalšími produkty a přístroji (např. izolační kit, sekvenátor, software na vyhodnocení dat) při jejich zařazení do diagnostického procesu zodpovídá uživatel soupravy.

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

15. CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY

Vyhodnocením dat v rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit firmy BioVendor – Laboratorní medicína a.s. byly stanoveny parametry analytické senzitivity a specificity.

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 DNA z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích, na cirkulující nádorové DNA (ctDNA), na syntetických DNA kontrolách a referenčním standardu se známým mutačním statusem. Výsledky stanovení genotypu genů *EGFR* a *HER2* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech, včetně opakování (senzitivita a specifita 100 %).

V rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN EGFR/HER2 Cancer 32-kit byly validovány mutace v genech *EGFR* a *HER2*, jejichž souhrn je uveden v Tabulka 5.

VZOR

Gen	Mutace
EGFR NM_005228.5	c.2127_2129del p.(Glu709_Thr710delinsAsp)
	c.2155G>A p.(Gly719Ser)
	c.2156G>C p.(Gly719Ala)
	c.2235_2249del p.(Glu746_Ala750del)
	c.2236_2250del p.(Glu746_Ala750del)
	c.2237_2255delinsT p.(Glu746_Ser752delinsVal)
	c.2240_2257del p.(Leu747_Pro753delinsSer)
	c.2303G>T p.(Ser768Ile)
	c.2310_2311insGGT p.(Asp770_Asn771insGly)
	c.2317_2322dup p.(His773_Val774dup)
	c.2369C>T p.(Thr790Met)
	c.2389T>A p.(Cys797Ser)
	c.2573T>G p.(Leu858Arg)
	c.2582T>A p.(Leu861Gln)
HER2 (ERBB2) NM_004448.4	c.829G>T p.(Asp277Tyr)
	c.929C>T p.(Ser310Phe)
	c.1976_1977delinsAG p.(Val659Glu)
	c.2033G>A p.(Arg678Gln)
	c.2263_2264delinsCC p.(Leu755Pro)
	c.2313_2324dup p.(Tyr772_Ala775dup)
	c.2331_2339dup p.(Gly778_Pro780dup)
	c.2524G>A p.(Val842Ile)
	c.2584A>G p.(Thr862Ala)
	c.2606T>G p.(Leu869Arg)

Tabulka 5: Seznam validovaných mutací v genech *EGFR* a *HER2*

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 při sekvenaci 32 vzorků zaplněn z 40 %.

2. Lze použít i jiný nástroj na analýzu dat?

Ano, na sekundární analýzu dat je možné použít např. Local Run Manager nebo BaseSpace Sequencing Hub.

3. Jaký typ sekvenátoru je vhodný pro analýzu vzorků připravených kity fastGEN?

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

4. Lze kombinovat soupravy na genotypizaci?

Ano, je možné vzájemně kombinovat všechny soupravy z řady fastGEN. V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, kontaktujte aplikační podporu.

5. Jak přistoupit k hodnocení výsledků v případě, že PC a NC nesplňují daná kritéria?

Příčiny nestandardních výsledků PC a NC mohou být různé. Doporučujeme ověřit kvalitu a správný typ použité PC (musí obsahovat mutace v cílových genech a jejich variantách), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. NC by při sekvenaci neměla vykazovat ready v oblastech zájmu obsažených v kitu. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

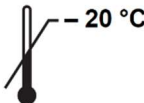
17. REFERENCE

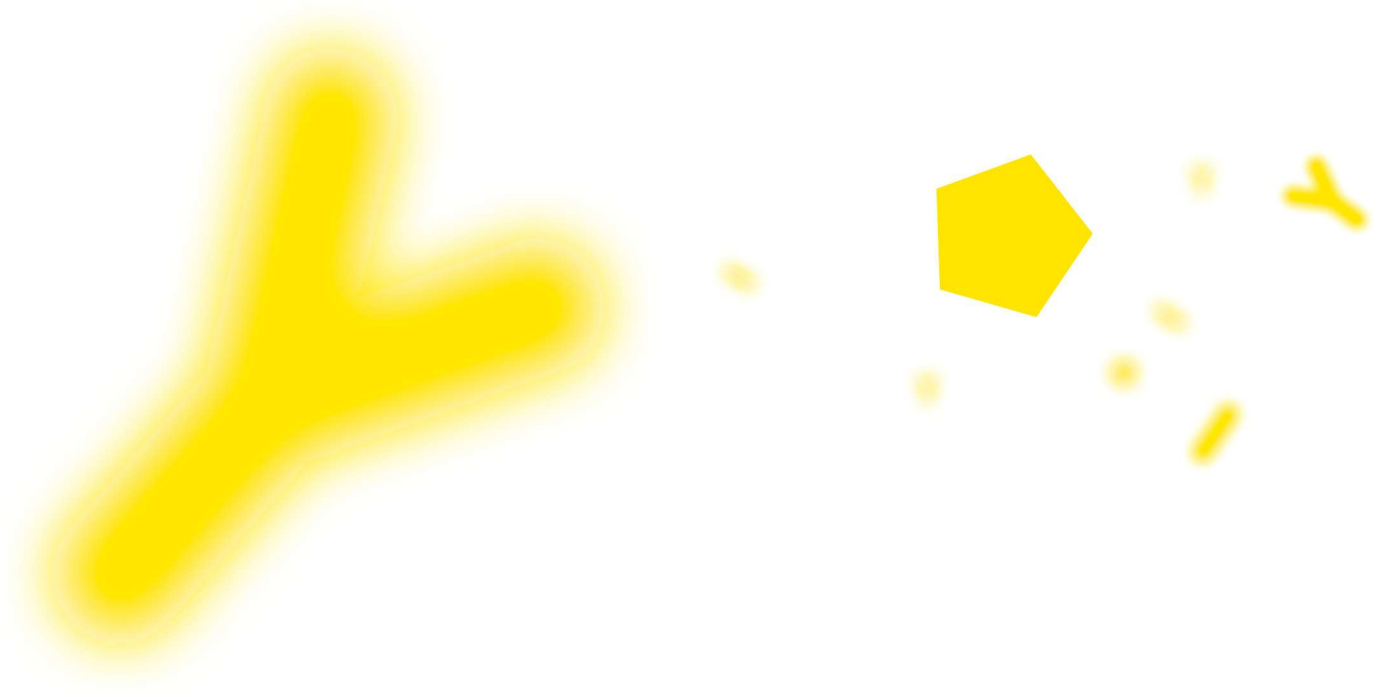
Pro více referencí k tomuto produktu navštivte naše webové stránky www.biovendor.com.

- [1] Wang F, Li C, Wu Q, Lu H. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Transl Cancer Res.* 2020;9(4):2982-2991. doi:10.21037/tcr.2020.03.10
- [2] John T, Taylor A, Wang H, Eichinger C, Freeman C, Ahn MJ. Uncommon EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: A systematic literature review of prevalence and clinical outcomes. *Cancer Epidemiol.* 2022;76:102080. doi:10.1016/j.canep.2021.102080.
- [3] Zhao J, Xia Y. Targeting HER2 Alterations in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Comprehensive Review. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:411-425. doi:10.1200/PO.19.00333
- [4] Zeng J, Ma W, Young RB, Li T. Targeting HER2 genomic alterations in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Cent.* 2021;1(2):58-73. Published 2021 May 3. doi:10.1016/j.jncc.2021.04.001

VZOR

18. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

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



VZOR



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com