

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN MPN Cancer Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0021

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)	10
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	11
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	12
12.	POSTUP STANOVENÍ	13
13.	VYHODNOCENÍ	19
14.	LIMITACE SOUPRAVY	21
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	22
16.	ČASTO Kladené DOTAZY	23
17.	REFERENCE	24
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	25

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
	CZE.001.A
Nové vydání	

1. URČENÝ ÚČEL

RDNGS0021 fastGEN MPN Cancer Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci vybraných oblastí genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* sekvenováním nové generace (NGS) u obecné populace. Přesná specifikace vybraných oblastí zájmu je uvedena v Tabulka 1. Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA. Soupravy obsahující reagenty jsou určeny k profesionálnímu použití v laboratoři.

Označení oblasti	Specifikace oblasti	Pozice oblasti dle GRCh38/hg38		
		Chromozom	Start	Stop
<i>JAK2</i> exon 12	kompletní exon	chr9	5069888	5070066
<i>JAK2</i> exon 13	kompletní exon	chr9	5072453	5072676
<i>JAK2</i> exon 14	kompletní exon	chr9	5073676	5073801
<i>JAK2</i> exon 16	část exonu	chr9	5078330	5078432
<i>MPL</i> exon 4	část exonu	chr1	43339466	43339579
<i>MPL</i> exon 10	část exonu	chr1	43349253	43349346
<i>MPL</i> exon 12	část exonu	chr1	43352616	43352719
<i>CALR</i> exon 9	kompletní exon	chr19	12943706	12943930

Tabulka 1: Specifikace vybraných oblastí zájmu soupravy fastGEN MPN Cancer Kit.

1.1 Použité zkratky

<i>CALR</i>	kalretikulin (Calreticulin)
<i>Ct</i>	číslo cyklu (Cycle Threshold)
<i>DNA</i>	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
<i>FAM/SYBR</i>	6-karboxyfluorescein/Asymmetrical Cyanine Dye
<i>JAK2</i>	Janusova kináza 2 (Janus Kinase 2)
<i>LoD</i>	limit detekce (Limit of Detection)
<i>MPL</i>	MPL protoonkogen, receptor pro trombopoetin (MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor)
<i>MPN</i>	myeloproliferativní neoplázie
<i>NC</i>	negativní kontrola (Negative Control)
<i>NGS</i>	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
<i>PC</i>	pozitivní kontrola (Positive Control)
<i>PCR</i>	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
<i>qPCR</i>	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 *JAK2*, *MPL* a *CALR*.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů.
- Souprava fastGEN MPN Cancer Kit je určena pro genotypizaci genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* u 16 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN MPN Cancer 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 MPN Cancer Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN MPN Cancer 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

Myeloproliferativní neoplázie (MPN) jsou skupinou hematologických onemocnění charakterizovaných zvýšenou proliferací krevních elementů v kostní dřeni. Mezi tato onemocnění se řadí pravá polycytémie (PV), esenciální trombocytémie (ET) a primární myelofibróza (PMF). Patogeneze MPN je úzce spojena s aktivujícími somatickými mutacemi v genech *JAK2*, *MPL* a *CALR*, které vedou ke konstitutivní aktivaci signální dráhy JAK-STAT.

Molekulární diagnostika mutací v genech *JAK2*, *MPL* a *CALR* je zásadní pro správné zařazení MPN dle WHO klasifikace, diferenciální diagnostiku, sledování minimální reziduální nemoci a výběr cílené terapie. Znalost mutačního profilu má rovněž významný prognostický a prediktivní potenciál, který stále více ovlivňuje personalizovanou medicínu. Genetický screening založený na metodě NGS je vysoce citlivý, specifický a vhodný pro diagnostiku [1–3].

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 flowcellu

5. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN MPN Cancer Kit slouží k přípravě sekvenační knihovny za účelem vyšetření mutačního statusu vybraných oblastí genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* 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 297 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 MPN Cancer 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 MPN Cancer Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN MPN Cancer 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 MPN Cancer Kit je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 16 vzorků, tj. k provedení 32 reakcí (Tabulka 2). Součástí soupravy jsou specifické Master Mixy obsahující všechny potřebné komponenty reakce pro geny *JAK2*, *MPL* a *CALR*.

Složení soupravy	Sekvence indexů P7	Sekvence indexů P5	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
MPN Master Mix B17 (A-B)	CCTATTAC	CTCAGACG	18	1	přímé použití
MPN Master Mix B18 (A-B)	GAGGATAC	CTCAGACG	18	1	přímé použití
MPN Master Mix B19 (A-B)	AGCTCGAC	CTCAGACG	18	1	přímé použití
MPN Master Mix B20 (A-B)	GTATACCA	CTCAGACG	18	1	přímé použití
MPN Master Mix C17 (A-B)	CCTATTAC	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix C18 (A-B)	GAGGATAC	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix C19 (A-B)	AGCTCGAC	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix C20 (A-B)	GTATACCA	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix D17 (A-B)	CCTATTAC	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
MPN Master Mix D18 (A-B)	GAGGATAC	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
MPN Master Mix D19 (A-B)	AGCTCGAC	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
MPN Master Mix D20 (A-B)	GTATACCA	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
MPN Master Mix E17 (A-B)	CCTATTAC	CAAGTTAT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix E18 (A-B)	GAGGATAC	CAAGTTAT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix E19 (A-B)	AGCTCGAC	CAAGTTAT	18	1	přímé použití
MPN Master Mix E20 (A-B)	GTATACCA	CAAGTTAT	18	1	přímé použití

Tabulka 2: Složení soupravy fastGEN MPN Cancer Kit.

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* (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 MPN Cancer Kit: Master Mix

Pro genotypizaci genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek MPN 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 MPN 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:

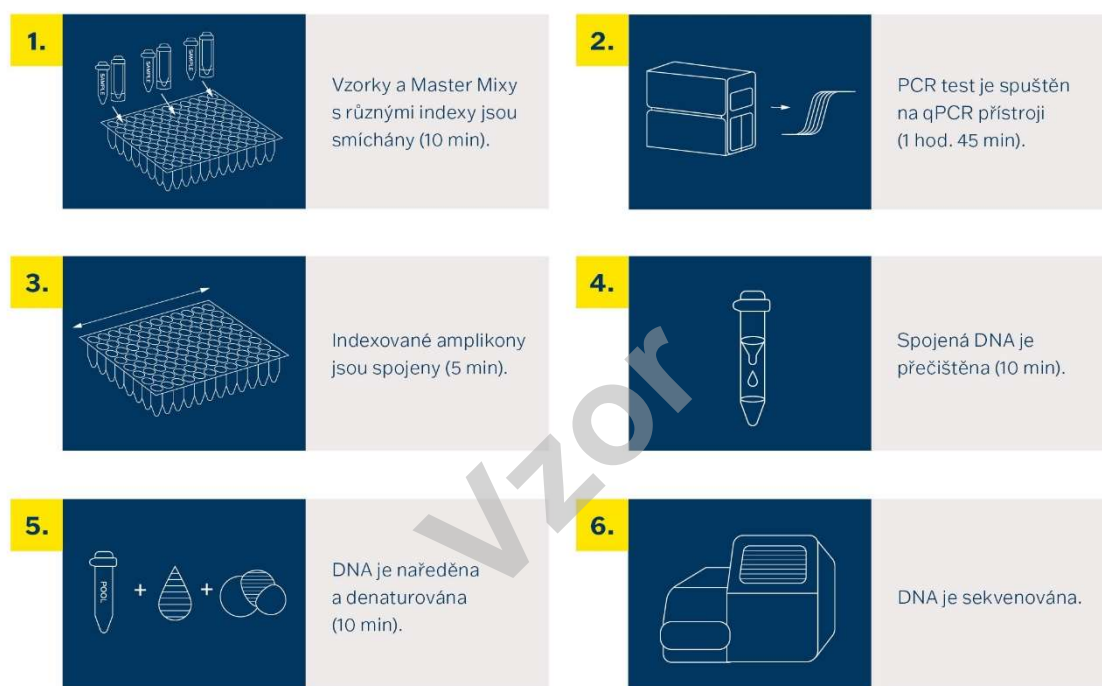
Do každého běhu testování pomocí fastGEN MPN Cancer Kit je doporučeno přidávat **pozitivní kontrolu (PC)**; standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu, není dodáván se soupravou) a **negativní kontrolu (NC)** pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. 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 1 % při minimálním vstupu 5 ng DNA.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 16 vzorků pro genotypizaci vybraných oblastí genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* 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 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 Mix A-B daného indexu (viz kapitola 11).
 - Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu pro Master Mix A-B daného indexu.

12.1.2 Příprava Master Mixů

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- 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 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 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 *JAK2*, *MPL* a *CALR*:
 - 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 48 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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 297)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- 297 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 MPN Cancer Kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina® a využívá Illumina® sekvenační primery.

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 pufr 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. Zředte 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.

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 0,1M 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. 170 µl DNA 5pM pool + 361 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 150µl; 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.

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 *JAK2/MPL/CALR*

Výsledek genotypizace genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byly detekovány varianty genů *JAK2*, *MPL* nebo *CALR* s frekvencí $\geq 1\%$ **při vstupu minimálně 5 ng DNA**.

V případě pozitivního nálezu mutace v genu *JAK2* v rozsahu frekvence 0,5–1 % 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 *JAK2*, *MPL* a *CALR* 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 MPN Cancer Kit je validována na DNA z periferní krve, 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 MPN Cancer Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci vybraných oblastí genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů nebo jiných než vybraných oblastí genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* uvedených v Tabulka 1, nejsou kitem fastGEN MPN Cancer 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 ampliconu.
- Výrobce deklaruje pozitivní nález mutací pouze v rozsahu stanoveném v analytické charakteristice soupravy (Tabulka 5). Stanovení dalších mutací nacházejících se ve vybraných oblastech genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* (viz Tabulka 1) je pomocí soupravy fastGEN MPN Cancer Kit možné, není však výrobcem deklarováno.
- Detekce současně se vyskytujících mutací *JAK2* c.1691G>A a c.1711G>A není pomocí soupravy fastGEN MPN Cancer Kit možná.
- Za validaci soupravy fastGEN MPN Cancer 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 MPN Cancer 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 DNA z periferní krve, na syntetických DNA kontrolách a referenčním standardu se známým mutačním statusem. Výsledky stanovení genotypu genů *JAK2*, *MPL* a *CALR* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech, včetně opakování (senzitivita a specifita 100 %).

V rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN MPN Cancer Kit byly validovány mutace v genech *JAK2*, *MPL* a *CALR*, jejichž souhrn je uveden v Tabulka 5.

Gen	Mutace
<i>JAK2</i> NM_004972.4	c.1849G>T p.(Val617Phe)
	c.1624_1629del p.(Asn542_Glu543del)
	c.1627_1632del p.(Glu543_Asp544del)
<i>MPL</i> NM_005373.3	c.1544G>T p.(Trp515Leu)
	c.1543T>C p.(Trp515Arg)
	c.1502T>C p.(Val501Ala)
<i>CALR</i> NM_004343.4	c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46)
	c.1176_1184del p.(Asp392_Asp394del)
	c.1116_1146del p.(Asp373Argfs*47)
	c.1103_1136del p.(Lys368Argfs*51)
	c.1154_1155insTTGTC p.(Lys385Asnfs*47)

Tabulka 5: Seznam validovaných mutací v genech *JAK2*, *MPL* a *CALR*.

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 16 vzorků zaplněn z 20 %.

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?

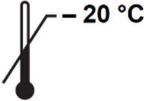
Příčiny nestandardních výsledků PC a NC mohou být různé. Doporučujeme ověřit kvalitu a správný typ použité PC (musí obsahovat mutace v cílových genech a jejich variantách), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. 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] Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Orazi A, Tefferi A. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J.* 2018 Feb 9;8(2):15. doi: 10.1038/s41408-018-0054-y. PMID: 29426921; PMCID: PMC5807384.
- [2] Maslah N, Verger E, Schlageter MH, Miclea JM, Kiladjian JJ, Giraudier S, Chomienne C, Cassinat B. Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls. *Ann Hematol.* 2019 Jan;98(1):111-118. doi: 10.1007/s00277-018-3499-y. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30259120.
- [3] Pizzi M, Croci GA, Ruggeri M, Tabano S, Dei Tos AP, Sabattini E, Gianelli U. The Classification of Myeloproliferative Neoplasms: Rationale, Historical Background and Future Perspectives with Focus on Unclassifiable Cases. *Cancers (Basel).* 2021 Nov 12;13(22):5666. doi: 10.3390/cancers13225666. PMID: 34830822; PMCID: PMC8616346.

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